



UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC MONTPELLIER II

Biologie, Géosciences, Agroressources & Environnement

Spécialité *Biologie et Evolution des Plantes*

Master 2 parcours « Biodiversité Végétale Tropicale »

**Échantillonnage et caractérisation moléculaire de la
biodiversité fongique des champignons du genre *Ganoderma*
associés aux phénomènes de dépérissement des palmiers à
huile au Cameroun**

Stage de M. Emeric LECOEUR

Encadrement au laboratoire (France)

Dr. Alba ZAREMSKI

CIRAD, UMR AGAP-GFP « Génétique Forêts et Palmiers »,
TA A-108/C Campus de Baillarguet,
34398, Montpellier Cedex 5 – France

Encadrement sur le terrain (Cameroun)

M. Hubert DE FRANQUEVILLE

PalmElit SAS

Bat. 14/Parc Agropolis, 2214 Bd. de la Lironde
34980, Montferrier sur Lez - France

21/01/2013 – 28/06/2013



UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC MONTPELLIER II

Biologie, Géosciences, Agroressources & Environnement

Spécialité *Biologie et Evolution des Plantes*

Master 2 parcours « Biodiversité Végétale Tropicale »

**Échantillonnage et caractérisation moléculaire de la
biodiversité fongique des champignons du genre *Ganoderma*
associés aux phénomènes de dépérissement des palmiers à
huile au Cameroun**

Stage de M. Emeric LECOEUR

Encadrement laboratoire (France)

Dr. Alba ZAREMSKI

CIRAD, UMR AGAP-GFP « Génétique Forêts et Palmiers »,
TA A-108/C Campus de Baillarguet,
34398, Montpellier Cedex 5 – France

Encadrement Terrain (Cameroun)

M. Hubert DE FRANQUEVILLE

PalmElit SAS

Bat. 14/Parc Agropolis, 2214 Bd. de la Lironde
34980, Montferrier sur Lez - France

21/01/2013 – 28/06/2013

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Jean-Marc Bouvet, pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe GFP-AGAP, et pour m'avoir permis de réaliser ce stage dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie également tout naturellement Madame Alba Zaremski pour avoir rendu cette expérience possible, pour ses conseils, sa bonne humeur, sa présence et son aide précieuse.

Je souhaite également remercier chaleureusement l'ensemble des personnes que j'ai pu rencontrer durant ma mission au Cameroun : Madame Claire Houssiau, Messieurs Jean-Pierre Charbon, Willem Baert, Alain Fayd'herbe, David Ferrat, Mme. Mercy N'Gum, ainsi que toutes les équipes du laboratoire et des plantations du groupe SOCAPALM.

Je remercie également tout le personnel de PalmElit, et tout particulièrement Messieurs Hubert de Franqueville et Tristan Durand-Gasselin pour leur présence et leur contribution précieuse durant ce projet de recherche.

Je remercie Monsieur Marc Ducousso pour m'avoir prodigué ses nombreux conseils et son aide durant ce stage.

Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire GFP, notamment Monsieur Maxime Mercière pour nos discussions stimulantes, Monsieur Alexandre Vaillant pour son aide et son talent pédagogique, ainsi que Madame Laetizia Camus-Kulandaivelu pour sa présence et son aide en génétique des populations.

Je remercie également Madame Roselyne Lannes pour son professionnalisme et pour toutes les démarches administratives difficiles et laborieuses lors de la préparation de la mission de collecte d'échantillons au Cameroun.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au sein du laboratoire, ou en dehors, pour le vent de fraîcheur et l'émulation scientifique qu'elles ont pu m'apporter durant ces quelques mois.

Je remercie enfin mes amis et ma famille qui m'ont soutenu, encouragé, motivé et stimulé durant ce projet de recherche.

Sommaire

I – Introduction	1
Programme de recherche	4
II – Matériel et méthodes	5
II.1 – Obtention de matériel biologique	5
II.2 - Préparation des isolats	6
II.3 - Extraction d’ADN	25
II.4 – Amplification des marqueurs par PCR	9
II.5 – Séquençage, traitement, et construction des arbres phylogénétiques	9
III – Résultats	10
III.1 – Matériel biologique	10
III.2 – Extraction d’ADN	31
III.3 – Amplification des marqueurs par PCR.....	13
III.4 - Séquençage, traitement, et construction des arbres phylogénétiques	14
IV - Discussion	15
IV.1 – Obtention du matériel biologique.....	15
IV.2 – Préparation des isolats	116
IV.3 – Extraction d’ADN	137
IV.4 – Amplification des marqueurs par PCR.....	137
IV - Conclusion	148
 Bibliographie	 17
Annexes	232

Liste des Figures et Tableaux

• Tableaux

- **Tableau 1** - Principaux pays producteurs de noix de palme dans le monde en 2011
- **Tableau 2** – Liste des isolats de référence du genre *Ganoderma* utilisés dans cette étude.
- **Tableau 3** – Récapitulatif des données relatives aux échantillons collectés en plantations commerciales au Cameroun.
- **Tableau 4** - Résultats de spectroanalyse des échantillons d'ADN obtenus lors de la comparaison de méthodes d'extraction d'ADN
- **Tableau 5** - Résultats de spectrophotanalyse des extraits d'ADN des échantillons de *Ganoderma spp.*

Figures

- **Figure 1** – Impact de la pourriture du stipe induite par *G. boninense* sur la densité de palmier en plantation. (A) parcelle saine ; (B) parcelle affectée par le *Ganoderma*.
- **Figure 2** – Macro-symptômes chez des palmiers infectés par *Ganoderma boninense*.
- **Figure 3** – Collecte d'échantillon de sporophore frais de *Ganoderma sp.* sur un palmier à huile en plantation.
- **Figure 4** – Isolat de *Ganoderma resinaceum* (CBS 109686) en culture pure sur milieu Malt-Agar.
- **Figure 5** - Schéma général des différentes phases de purification d'un isolat issu d'un sporophore frais.
- **Figure 6** – Isolat DBGF08 de *Ganoderma sp.* (A) en phase de purification sur milieu WA-SC et (B) en culture pure sur milieu PDA-C.
- **Figure 7** – Détails des marqueurs et des oligonucléotides utilisés dans cette étude.
- **Figure 8** – Exemples de produits PCR sur gel d'agarose 1% après électrophorèse.
- **Figure 9** – (A) ADN stock, (B) ADN à 5 ng.µL⁻¹ et (C) amorces nucléotidiques sur gel d'agarose 1% après électrophorèse.

Tableau 1 - Principaux pays producteurs de noix de palme dans le monde en 2011.
(FAO, 2013)

Pays	produit	Production 2011 (Tonnes)	Surfaces cultivées 2011 (hectares)
Indonésie	Noix de palme	101 700 000	6 090 000
Malaisie	Noix de palme	87 825 000	4 010 000
Thaïlande	Noix de palme	10 776 800	600 000
Nigéria	Noix de palme	8 500 000	3 200 000
Colombie	Noix de palme	3 780 000	165 000
Ghana	Noix de palme	2 004 300	360 000
Équateur	Noix de palme	2 000 000	130 000
Papouasie-Nouvelle-Guinée	Noix de palme	1 730 000	119 000
Guatemala	Noix de palme	1 653 000	59 000
Cameroun	Noix de palme	1 575 000	124 000
Honduras	Noix de palme	1 556 350	110 000
Côte d'Ivoire	Noix de palme	1 500 000	225 000
Brésil	Noix de palme	1 301 190	109 080
République démocratique du Congo	Noix de palme	1 163 580	179 000
Costa Rica	Noix de palme	1 050 000	60 000
Guinée	Noix de palme	830 000	310 000
Chine	Noix de palme	670 000	50 000
Philippines	Noix de palme	540 913	49 328
Mexique	Noix de palme	507 011	32 701
Pérou	Noix de palme	361 724	30 594
Venezuela (République bolivarienne du)	Noix de palme	325 000	26 500
Bénin	Noix de palme	295 000	29 000
Angola	Noix de palme	280 000	23 000
Îles Salomon	Noix de palme	220 000	14 000
République dominicaine	Noix de palme	212 300	13 800
Sierra Leone	Noix de palme	212 000	26 500
Libéria	Noix de palme	174 000	17 000

I - Introduction

Le palmier à huile, *Elaeis guineensis* Jacq., est une plante tropicale monocotylédone de la famille des *Arecaceae* originaire d'Afrique de l'Ouest. Elle est cultivée à grande échelle dans la zone intertropicale pour ses fruits oléagineux, et représente aujourd'hui la première plante oléagineuse cultivée dans le monde. Ainsi, sa culture contribue de façon importante à l'économie de nombreux pays tropicaux, notamment en Asie du Sud-est, en Afrique et en Amérique latine. Les deux principaux producteurs mondiaux sont l'Indonésie et la Malaisie, avec respectivement 101 et 88 millions de tonnes de noix de palme produites chaque année, avec des surfaces cultivées atteignant respectivement plus de 6 et 4 millions d'hectares (Tableau 1 ; FAO, 2013). En Afrique, le Nigéria, le Ghana, le Cameroun, la République Démocratique du Congo et la Guinée constituent également une part importante de la production d'huile de palme, dans un contexte où ce secteur agricole est en expansion extrêmement rapide, et où les surfaces cultivées ont pratiquement été quintuplées depuis 1961. En 2013, les surfaces cultivées dépassent 16 millions d'hectares et constituent une agro-industrie générant annuellement un marché de plus de 30 milliards de US\$ (FAO 2013). **Toutefois, plusieurs menaces biologiques pèsent sur cette industrie, dont l'une des plus sérieuses est le phytopathogène fongique actuellement désigné sous le nom de *Ganoderma boninense*, agent causal principal de la pourriture du stipe.**

Le palmier à huile a été introduit par les colons hollandais à Sumatra en 1875. Les premières plantations à grande échelle en Asie du Sud-est ont pour la plupart été établies au début du XX^{ème} siècle. Il apparaît que l'incidence de la maladie, faible à l'établissement de la plantation, s'amplifie à chaque génération de replantation pour atteindre des seuils critiques en 4^{ème} ou 5^{ème} génération, tels qu'observés aujourd'hui en Asie du Sud-est. Le champignon peut alors causer, dans les cas les plus sévères, la mort précoce de plus de la moitié des palmiers (cf. Figure 1) (Corley et Tinker, 2008). Aujourd'hui, cette maladie émerge dans les plantations commerciales en Afrique de l'Ouest, établies depuis les années 1970. **L'étude de la diversité à la fois géographique et génétique du genre *Ganoderma* est donc capitale afin de mieux comprendre l'histoire évolutive de l'épidémie et les facteurs écologiques qui sont responsables de l'émergence de ce phytopathogène.**

Le genre *Ganoderma* regroupe plus de 250 espèces de champignons filamenteux lignivores, appartenant au phylum des basidiomycètes (Agaricomycota, Polyporales, *Ganodermataceae*) (Flood et Hassan, 2004). Il s'agit de champignons pathogènes dégradant le bois, caractérisés comme une « pourriture blanche » de par leur capacité à dégrader la lignine



Figure 1 – Impact de la pourriture du stipe induite par *G. boninense* sur la densité de palmier en plantation. (A) parcelle saine ; (B) parcelle affectée par le *Ganoderma* (Nord-Sumatra)

des tissus végétaux (Adaskaveg et Gilbertson, 1994). Le genre *Ganoderma* **présente une répartition pan-continentale, tout en étant particulièrement abondant dans la zone intertropicale** où il est notamment responsable de lourds dégâts dans les plantations commerciales. Originellement présent dans les plantations de palmier à huile en Asie du Sud-est où il cause des dégâts importants, on le retrouve aujourd'hui dans les plantations d'Afrique, mais également en Amérique du Sud où il a récemment fait son apparition (Turner 1981 ; Zaremski *et al.*, 2013). Ce champignon est associé à deux maladies sévères chez le palmier à huile : la pourriture basale et la pourriture apicale du stipe (*cf.* Figure 2) (Miller *et al.*, 1994 ; Paterson, 2007 ; Utomo et Niepold, 2000). Ces pathologies entraînent de lourdes pertes économiques en causant le dépérissement puis la mort par nécrose et stress hydrique des individus affectés, tout en se maintenant durablement dans le sol des parcelles attaquées (Ariffin *et al.*, 2000 ; Sanderson *et al.*, 2000 ; Turner, 1981). En Asie du Sud-Est, il a été estimé que 1% d'incidence de la maladie en plantation en Indonésie représenterait déjà à lui seul un manque à gagner de 38 millions de US\$ chaque année ; les seuils généralement observés sont toutefois bien plus élevés (Darmono, 2000).

En Asie du Sud-est, *Ganoderma boninense* est identifié comme le pathogène principal du palmier à huile en plantations commerciales où, dans la grande majorité des cas, il est responsable des dégâts observés (Idris, 1999, Soepena *et al.*, 2000). Cette espèce a une aire de distribution naturelle restreinte à l'Asie et à l'Océanie, et on le retrouve également associé à *Cocos nucifera*, où il n'entraîne que très peu de dégâts en agissant plutôt selon un profil de champignon lignivore opportuniste (Flood et Hasan, 2004). Ces observations suggèrent que **ce ganoderme aurait pu s'adapter en moins de 150 ans à un nouvel hôte originaire d'Afrique, et qu'il aurait acquis une agressivité particulière vis-à-vis de *E. guineensis*, le classant de ce fait comme un véritable pathogène. Cette vitesse d'adaptation exceptionnelle fait du genre *Ganoderma* un sujet d'étude particulièrement intéressant, notamment pour l'étude des mécanismes évolutifs des phytopathogènes fongiques.**

En Afrique de l'Ouest, où les plantations commerciales de palmier à huile n'ont été établies que plus tardivement, le pathosystème *E. guineensis* – *Ganoderma* est plus rare et à ce jour peu caractérisé. Les plantations sont pour la plupart en fin de première génération de culture, et la maladie est généralement anecdotique et restreinte aux palmiers âgés. Certaines plantations en début de seconde génération font toutefois face à des taux d'incidence d'infection par le *Ganoderma* de plus de 40%, y compris sur des palmiers plus jeunes, selon un profil similaire à celui observé en Asie du Sud-est durant l'émergence de la maladie (Lecoeur, 2013 ; Turner, 1981). De plus, **contrairement à la zone asiatique, les espèces de**

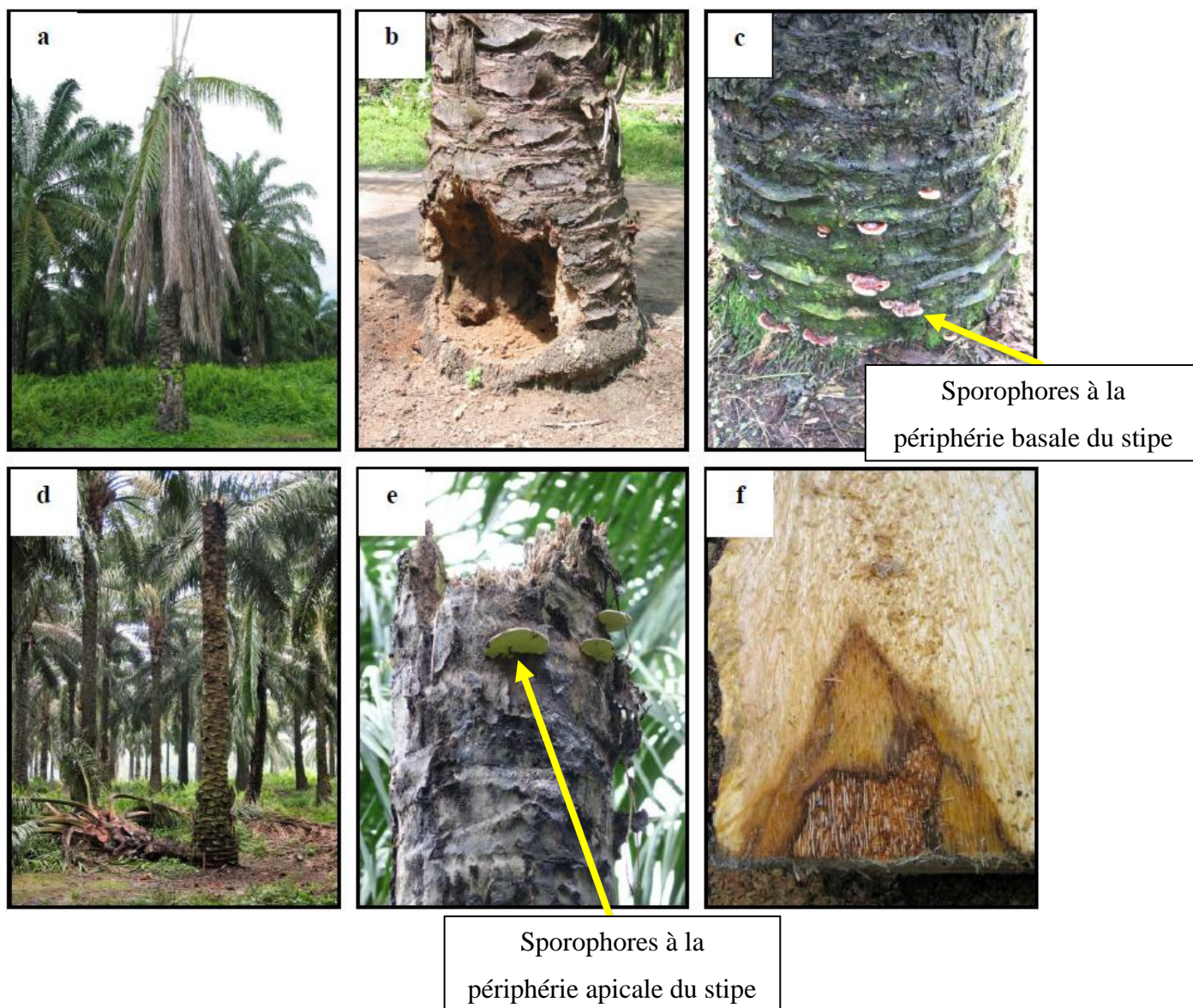


Figure 2 – Macro-symptômes chez des palmiers infectés par *Ganoderma boninense*. Les photos a, b et c représentent les symptômes standards de la pourriture basale du Stipe (BSR) observés en plantation industrielle alors que d, e et f sont caractéristiques d'une pourriture apicale du stipe (USR). Dans les deux types de pourriture, BSR et USR, la colonisation interne du stipe du palmier par l'agent pathogène est observée par une coloration brune des tissus hôtes (f). La présence de sporophores peut être visible à la périphérie basale (c) ou apicale du stipe (e). Origine : Indonésie.

***Ganoderma* responsables du dépérissement du palmier à huile en Afrique semblent multiples** (Kinge *et al.* 2012). De même, plusieurs études illustrent que *G. boninense* n'est pas l'unique espèce de *Ganoderma* pouvant s'attaquer aux palmiers à huile, y compris en Asie du Sud-Est (Idris et Ariffin, 2004 ; Kinge *et al.*, 2012 ; Miller *et al.*, 1999 ; Pilotti *et al.*, 2003 ; Turner, 1981 ; Utomo et Nepold, 2000). À ce jour, nous ne savons pas comment la compétition interspécifique entre les différentes espèces appartenant au genre *Ganoderma* présentes dans l'environnement naturel peut aboutir à l'émergence d'une ou plusieurs espèces aux traits pathogènes. Il est intéressant de comprendre comment les espèces de *Ganoderma* lignivores opportunistes, normalement observées sur le bois mort, ont pu acquérir des traits pathogènes et une agressivité telle qu'on les retrouve dorénavant sur des palmiers adultes sains. Il convient donc de mieux caractériser le complexe d'espèces responsables du dépérissement du palmier à huile en Afrique, ainsi que d'étudier leur diversité génétique afin de mieux comprendre la structure du genre *Ganoderma*. De même, l'identification précise des espèces agressives en plantation au Cameroun permettra d'orienter la stratégie de recherche de l'entreprise PalmElit pour le développement de matériel végétal tolérant aux pathogènes. Toutefois, en raison d'une morphologie et d'une anatomie complexe et présentant une forte hétérogénéité, la taxonomie basée sur des méthodes d'observation descriptives est aujourd'hui mal connue, voire même confuse selon certains auteurs (Flood et Hassan, 2004 ; Gottlieb et Wright, 1999 ; Miller *et al.*, 2000 ; Moncalvo *et al.*, 1995 ; Moncalvo, 2000 ; Ryvarden, 1995 ; Welti, 2009 ; Welti, 2013). Cependant, le florilège de données génétiques et de techniques de biologie moléculaire aujourd'hui disponibles ont permis de préciser les relations phylogénétiques entre les différentes espèces du genre *Ganoderma* et de corriger en partie leur taxonomie (Hong et Jung, 2004 ; Latiffah, 2002).

Suite aux travaux de 2012 ayant développé l'utilisation de l'ADN ribosomal, nous souhaitons à présent compléter cette technique par une caractérisation morpho-anatomique d'échantillons de *Ganoderma* collectés en plantation en Afrique. Nous continuerons également les études phylogénétiques à partir des marqueurs génétiques à évolution rapide (complexe ITS) ou plus lente (mt-SSU, nuc-SSU, nuc-LSU) pour évaluer la diversité génétique des pathogènes africains du genre *Ganoderma*.

L'intérêt majeur de ce travail est de caractériser et de comprendre la structuration génétique d'un pathogène fongique émergent. Ce travail repose sur un dispositif de terrain en Afrique de l'Ouest où le pathosystème *Ganoderma*–*E. guineensis* a été caractérisé pour être à un stade différent de développement par rapport à l'Asie du Sud-Est.

Programme de recherche

Dans le cadre du projet GANODIV, regroupant le CIRAD et son partenaire PalmElit, les activités de recherche se focalisent sur la caractérisation de la diversité génétique du pathogène du palmier à huile *Ganoderma*. L'objectif principal de ces travaux est d'établir un profil plus précis de la diversité génétique des pathogènes fongiques associés au dépérissement du palmier à huile, dans le but de valider le développement de matériel végétal présentant une tolérance au *Ganoderma* par l'entreprise PalmElit, en partenariat avec les planteurs en Asie et en Afrique. L'effort de recherche se focalise aujourd'hui sur le Cameroun, où est implanté le groupe SOCAPALM qui est l'un des principaux partenaires de PalmElit (Zaremski *et al.*, 2013).

Dans cette étude nous chercherons à identifier, par des techniques de biologie moléculaire développées depuis 2009 et complétées par des méthodes de description morpho-anatomiques, les espèces fongiques appartenant principalement au genre *Ganoderma* responsables du dépérissement de *E. guineensis* dans des plantations commerciales de palmier à huile au Cameroun. Nous étudierons en parallèle des isolats de référence de différentes espèces de *Ganoderma* en culture pure.

Nous chercherons également à caractériser la diversité génétique intra et interspécifique entre les différents individus de *Ganoderma* collectés sur les palmiers à huile malades mais également dans les milieux naturels adjacents, afin d'illustrer une éventuelle structuration génétique, et d'émettre des hypothèses sur les facteurs qui en sont responsables (*e.g.* origine géographique, substrat du pathogène, conditions environnementales, mécanismes de dispersion à longue distance, reproduction sexuée) (Paterson, 2007 ; Zaremski *et al.*, 2013).

Enfin, la construction d'une base de données propriétaire, à partir de souches de référence de différentes espèces de *Ganoderma* représentant les 6 groupes monophylétiques de ce taxon, nous permettra de replacer nos échantillons au sein d'une phylogénie la plus exhaustive possible du genre *Ganoderma* et de mieux caractériser les espèces responsables des dégâts dans les plantations étudiées au Cameroun.

Tableau 2 – Liste des isolats de référence du genre *Ganoderma* utilisés dans cette étude.
Origine : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center.

Référence CBS	Nom du taxon	Origine
CBS 109416	<i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer)	Taiwan
CBS 122489	<i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer)	Pays-Bas
CBS 128580	<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat.	Taiwan
CBS 516.96	<i>Ganoderma carnosum</i> Pat.	France
CBS 109682	<i>Ganoderma lipsiense</i> (Batsch) G.F. Atk.	Argentine
CBS 122450	<i>Ganoderma lipsiense</i> (Batsch) G.F. Atk.	Autriche
CBS 109688	<i>Ganoderma lobatum</i> (Schwein.) G.F. Atk.	Argentine
CBS 109689	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Argentine
CBS 270.81	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	France
CBS 429.84	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Louisiane (USA)
CBS 271.88	<i>Ganoderma meredithae</i> Adask. & Gilb.	Louisiane (USA)
CBS 218.36	<i>Ganoderma mirabile</i> (Lloyd) C.J. Humphrey	Philippines
CBS 128579	<i>Ganoderma multipileatum</i> Hou.	Taiwan
CBS 109686	<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	Argentine
CBS 194.76	<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	Pays-Bas
CBS 220.36	<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	Floride (USA)
CBS 109677	<i>Ganoderma tornatum</i> (Pers.) Bres.	Argentine
CBS 109679	<i>Ganoderma tornatum</i> (Pers.) Bres.	Chili
CBS 128582	<i>Ganoderma tropicum</i> (Jungh.) Bres.	Taiwan
CBS 128581	<i>Ganoderma weberianum</i> (Bres. & Henn.	Taiwan



Figure 3 – Collecte d'échantillon de sporophore frais de *Ganoderma sp.* sur un palmier à huile en plantation. Origine : Dibombari estate, SOCAPALM, Cameroun.

II – Matériel et méthodes

II.1 – Obtention de matériel biologique

II.1.1 – Isolats de référence

La première étape de ce travail a été l'identification des isolats de *Ganoderma spp.* pertinents pour cette étude, et disponibles sous forme de cultures pures dans les collections fongiques. Ces isolats constitueront les souches de référence pour les études phylogénétiques de la famille des *Ganodermataceae*. Après une analyse de la littérature, nous souhaitons obtenir :

- Des isolats de différentes espèces appartenant aux sept groupes monophylétiques caractérisés dans la littérature pour le genre *Ganoderma*
- Des isolats des différentes espèces du genre *Ganoderma* identifiées dans la littérature comme pathogènes du palmier à huile
- Des isolats des différentes espèces du genre *Ganoderma* dont la présence a été rapportée au Cameroun

Pour cela, la base de données référençant les souches fongiques du Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center) a été analysée afin de sélectionner les isolats de *Ganoderma spp.* correspondant à nos critères. Les 20 souches sélectionnées sont présentées dans le Tableau 2.

II.2 – Echantillonnage en plantations

La deuxième étape de ce travail a été l'échantillonnage de sporophores de *Ganoderma spp.* au Cameroun, durant une mission de terrain qui s'est déroulée du 24 février au 22 mars 2013. Les sporophores (ou sporophores - organes de la fructification) produits par le champignon et localisés à la périphérie du stipe ont été récoltés sur 4 sites de plantations de palmier à huile du groupe SOCAPALM (SOciété CAMerounaise des PALMeraies) et sur un site du groupe CDC (Cameroon Development Corporation). Les sites ont été choisis en fonction des rapports d'incidence de la maladie, et les plantations peu affectées n'ont pas été considérées pour cette étude. Ainsi, des prélèvements de sporophores frais en conditions d'infection naturelle sur des palmiers à huile atteints de pourriture du stipe ont été réalisés sur les sites de Dibombari, d'Edéa, de Kienké et de SAFACAM pour la SOCAPALM, et sur le site de Mungo pour la CDC (cf. Figure 3). Le protocole de prélèvement des échantillons ainsi que la fiche de collecte détaillée sont présentés en Annexe 2.

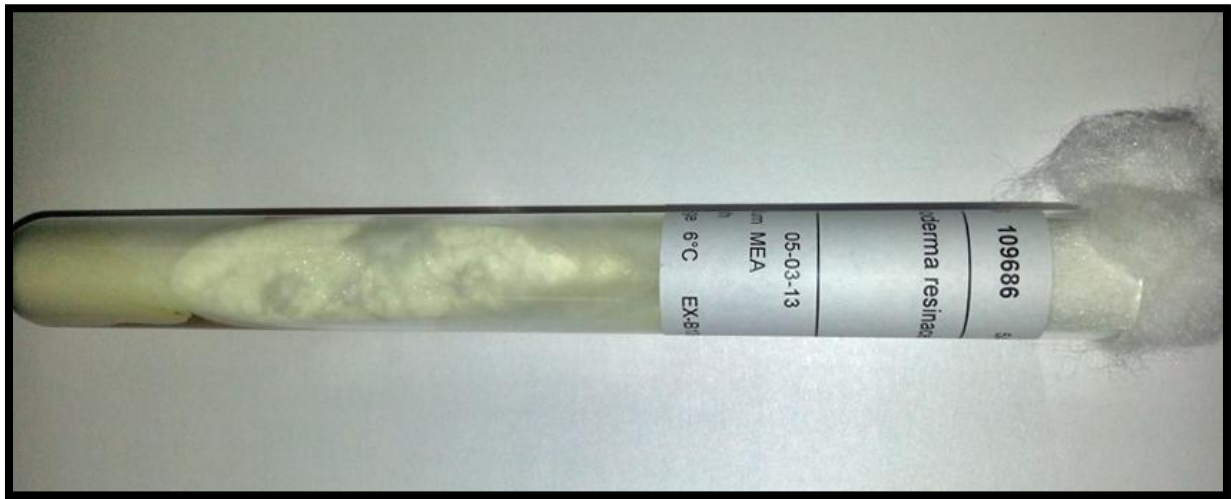


Figure 4 – Isolat de *Ganoderma resinaceum* (CBS 109686) en culture pure sur milieu Malt-Agar. Origine : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center.

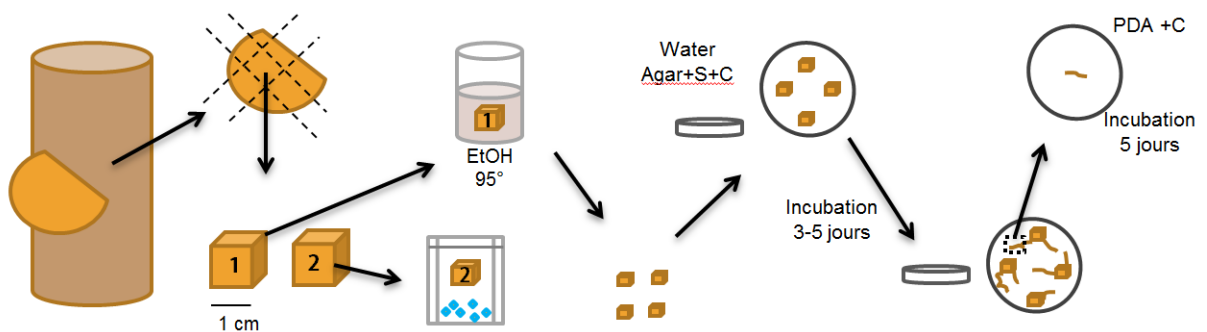


Figure 5 - Schéma général des différentes phases de purification d'un isolat issu d'un sporophore frais.

II.2 - Préparation des isolats

II.2.1 - Isolats de référence (laboratoire GFP, Montpellier)

Lors de la réception des 20 isolats du CBS au laboratoire (*cf.* Figure 4), nous avons immédiatement procédé à une multiplication des isolats en boîte de Petri sur de nouveaux milieux de culture PDA (Potato Dextrose Agar) supplémentés en chloramphénicol, ainsi que sur ces mêmes milieux auxquels ont été ajoutés des disques de nitrocellulose. Cet élément permet par la suite de séparer facilement le mycélium de la gélose, afin de limiter les impuretés lors des processus d'extraction de l'ADN fongique. Pour chaque isolat, il a été réalisé 2 cultures sur milieu PDA-chloramphénicol ainsi que 2 cultures sur PDA-chloramphénicol avec film de nitrocellulose. Les cultures ont été incubées à 28°C à l'obscurité pour stimuler la croissance du mycélium, et ont été observées chaque semaine. Les détails de composition des différents milieux de culture sont présentés en Annexe 3.

II.2.2 - Isolats du Cameroun (laboratoire de phytopathologie de Dibombari, Cameroun)

Après la collecte des sporophores frais sur les palmiers à huile infectés des différentes plantations, ils ont été conservés à 4°C et acheminés au laboratoire de phytopathologie de Dibombari (SOCAPALM), où se sont déroulées les étapes de mise en culture et de purification des isolats (*cf.* Figure 5).

Tout d'abord, les sporophores ont été nettoyés à l'eau distillée avec l'aide d'une brosse, pour éliminer les débris végétaux et les éventuels contaminants. Ils ont été ensuite séchés à l'aide de papier absorbant, puis les parties externes du sporophore ainsi que l'hyménium ont été éliminés à l'aide d'un couteau et d'un scalpel stérilisés. L'hyménium doit être éliminé car, contrairement à l'hyménophore qui est dicaryotique, il s'agit d'un tissu cellulaire majoritairement monocaryotique (Carlyle *et al.*, 2001). Dans le but d'obtenir un isolat génétiquement identique à celui ayant produit la fructification récoltée, nous devons utiliser uniquement du tissu dicaryotique. Cela est important afin d'éviter la mise en culture puis la fusion de deux mycélium haploïdes qui produiront, certes, un mycélium diploïde, mais génétiquement différent de l'isolat d'origine. Après cette étape de préparation du sporophore, le cube d'hyménophore ainsi obtenu est brièvement immergé dans de l'éthanol à 96° sous une hotte à flux laminaire pour désinfecter l'échantillon, puis il est déposé dans une boîte de Petri stérile sous la hotte quelques minutes pour permettre à l'alcool de s'évaporer. Les parties externes du cube sont encore une fois éliminées à l'aide d'un scalpel stérile afin d'obtenir un fragment d'environ 1cm³. Elles seront déshydratées et conservées dans des sachets contenant

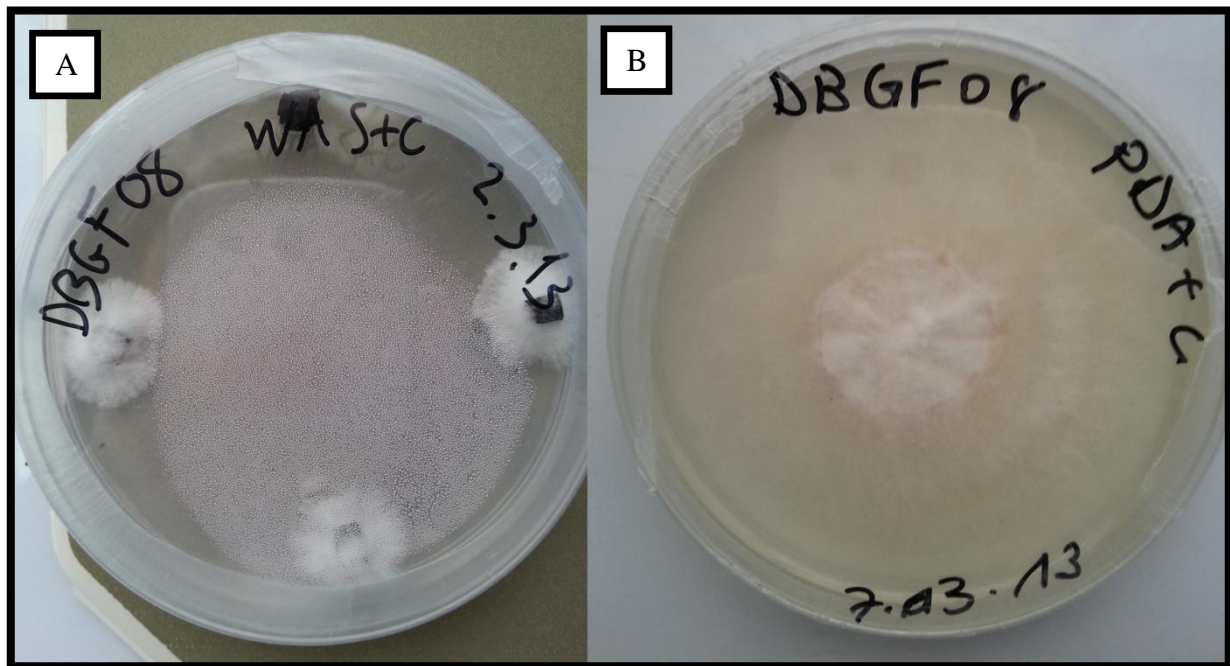


Figure 6 – Isolat DBGF08 de *Ganoderma sp.* (A) en phase de purification sur milieu WA-SC et (B) en culture pure sur milieu PDA-C. Origine : Dibombari Estate, SOCAPALM, Cameroun.

du SilicaGel, ce qui nous permet de conserver du matériel biologique de chaque échantillon qui servira à réaliser l'extraction d'ADN si les isolats en culture pure ne peuvent pas être obtenus. Le cube est alors débité en 16 fragments de quelques millimètres, qui seront déposés dans 4 boîtes de Petri contenant un milieu Water-Agar supplémenté en chloramphénicol et en streptomycine, à raison de 4 fragments équitablement répartis dans chaque boîte de Petri (cf. Figure 6). Ce milieu de culture est un milieu sélectif non nutritif, ce qui permet d'isoler efficacement le mycélium issu des sporophores de *Ganoderma spp.* tout en limitant la présence et le développement de contaminants. Les cultures ont été incubées à 28°C à l'obscurité pour stimuler la croissance du mycélium, et ont été observées quotidiennement. Lorsqu'un mycélium d'aspect pur est observable, un fragment de ce dernier est transféré sur milieu PDA supplémenté en chloramphénicol, et incubé à 28°C (cf. Figure 6). Les détails de composition des différents milieux de culture sont présentés en Annexe 3.

Après environ 10 jours d'incubation, 8 fragments de gélose des isolats purifiés sur PDA-chloramphénicol ont été transférés dans des tubes Wheaton stériles contenant 5 ml d'eau Milli-Q stérile, sous la hotte à flux laminaire. Cette étape nous permet de conserver l'isolat en culture pure durant 6 mois sans perte de vigueur, et facilite également son transport. De la même façon, pour chaque isolat, un fragment de gélose PDA-chloramphénicol colonisé par le mycélium a été déposé de façon stérile dans un tube Wheaton contenant 2 ml de milieu PDA-chloramphénicol. Les tubes ont ensuite été incubés à 28°C à l'obscurité jusqu'à la colonisation complète du milieu de culture. Cette étape nous permet de nous assurer que, en cas de contamination des tubes Wheaton contenant de l'eau stérile et les fragments de milieux de culture colonisés, nous pourrions tout de même remettre en culture l'isolat après l'acheminement des échantillons en France.

Lors du retour en France, les différents isolats ont été remis en culture sur milieu PDA-chloramphénicol, à la fois dans des boîtes de Petri classiques et dans des boîtes de Petri où le milieu de culture a été recouvert d'un film de nitrocellulose. Les isolats ont été incubés à l'obscurité à 28°C à 80% d'humidité jusqu'à colonisation complète du milieu de culture.

II.2.3 – Caractérisation morpho-anatomique

Un sporophore représentatif de ceux collectés en plantation au Cameroun a également fait l'objet d'une caractérisation basée sur les clés de détermination morphologiques et anatomiques, permettant l'identification du champignon au niveau du genre et/ou de l'espèce. Cette approche vise à compléter la caractérisation basée sur les données moléculaires, qui n'est pas infallible car basée sur des données publiques difficilement vérifiables.

II.3 - Extraction d'ADN

II.3.1 – Comparaison de méthodes

Nous avons en premier lieu réalisé une comparaison de plusieurs méthodes d'extraction d'ADN disponibles au laboratoire : la méthode *Doležel-MATAB* (cf. Annexe 4) et le kit *AdemTech Plant Prep-Adem-Kit*, afin de déterminer la technique d'extraction la plus rapide et efficace en terme de concentration et de pureté de l'échantillon final. Pour cela, 3 répétitions ont été réalisées pour chaque protocole considéré. Pour le Kit AdemTech, nous avons réalisé 4 protocoles différents en faisant notamment varier le temps de lyse (1h ou 2h), et l'extraction préalable ou non des noyaux.

II.3.2 – Extraction d'ADN des échantillons du Cameroun

Nous avons ensuite procédé à l'extraction d'ADN de nos échantillons du Cameroun et de nos isolats de référence. À l'aide d'un scalpel stérile, 500 mg de mycélium des isolats en culture pure sur milieu PDA-chloramphénicol avec film de nitrocellulose ont été prélevés, puis transférés dans un tube Eppendorf 2 ml immédiatement plongé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C, afin d'éviter toute dégradation du matériel biologique. Pour les échantillons n'ayant pas pu être isolés en culture pure, les fragments de sporophore ont fait l'objet d'un pré-broyage à l'aide d'un broyeur à couteaux, et la poudre ainsi obtenue a également été transférée dans un tube Eppendorf 2 ml, plongé dans l'azote liquide et conservé à -80°C. Le matériel biologique (mycélium ou poudre de sporophore) a ensuite été broyé à l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon préalablement refroidi, puis l'extraction d'ADN a été réalisée selon le protocole *Doležel-MATAB* présenté en Annexe 4.

La quantité d'ADN de nos échantillons a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre *BioSpec Mini* de marque *Shimadzu*. L'absorbance A1 (260 nm), les ratios A1/A2 (260/280 nm) et A1/A3 (260/230 nm) ainsi que la concentration de notre ADN ont été mesurés afin de déterminer le succès de notre extraction ainsi que la pureté de nos échantillons. Les ratios A1/A2 et A1/A3 doivent se rapprocher de 1,8 pour pouvoir qualifier les échantillons de « purs ». Nous avons utilisé une cellule de précision de marque Hellma en Quartz SUPRASIL (ref. 105.810-UVS) à miroir aluminium (ref. 665.703) permettant d'utiliser uniquement 4 µL de nos extraits, tout en ayant un trajet optique simulé de 1 centimètre nécessaire pour les mesures d'absorbance.

Marqueur	ITS1-5.8S-ITS2	nuc-LSU (28S)	nuc-SSU (18S)	mt-SSU
primer forward	ITS1	LR0R	PNS1	MS1
primer reverse	ITS4	LR5	NS8	MS2
Séquence oligo forward (5'-3')	TCCGTAGGT GAACCTGCG G	ACCCGCTG AACTTAAG C	CCAAGCTTGAATTCG TAGTCATATGCTTGT C	CAGCAGTCAAGA ATATTAGTCAAT G
Séquence oligo reverse (5'-3')	TCCTCCGCT TATTGATATG C	TCCTGAGG GAAACTTC G	TCCGCAGGTTACCT ACGGA	GCGGATTATCGA ATTAATAAC

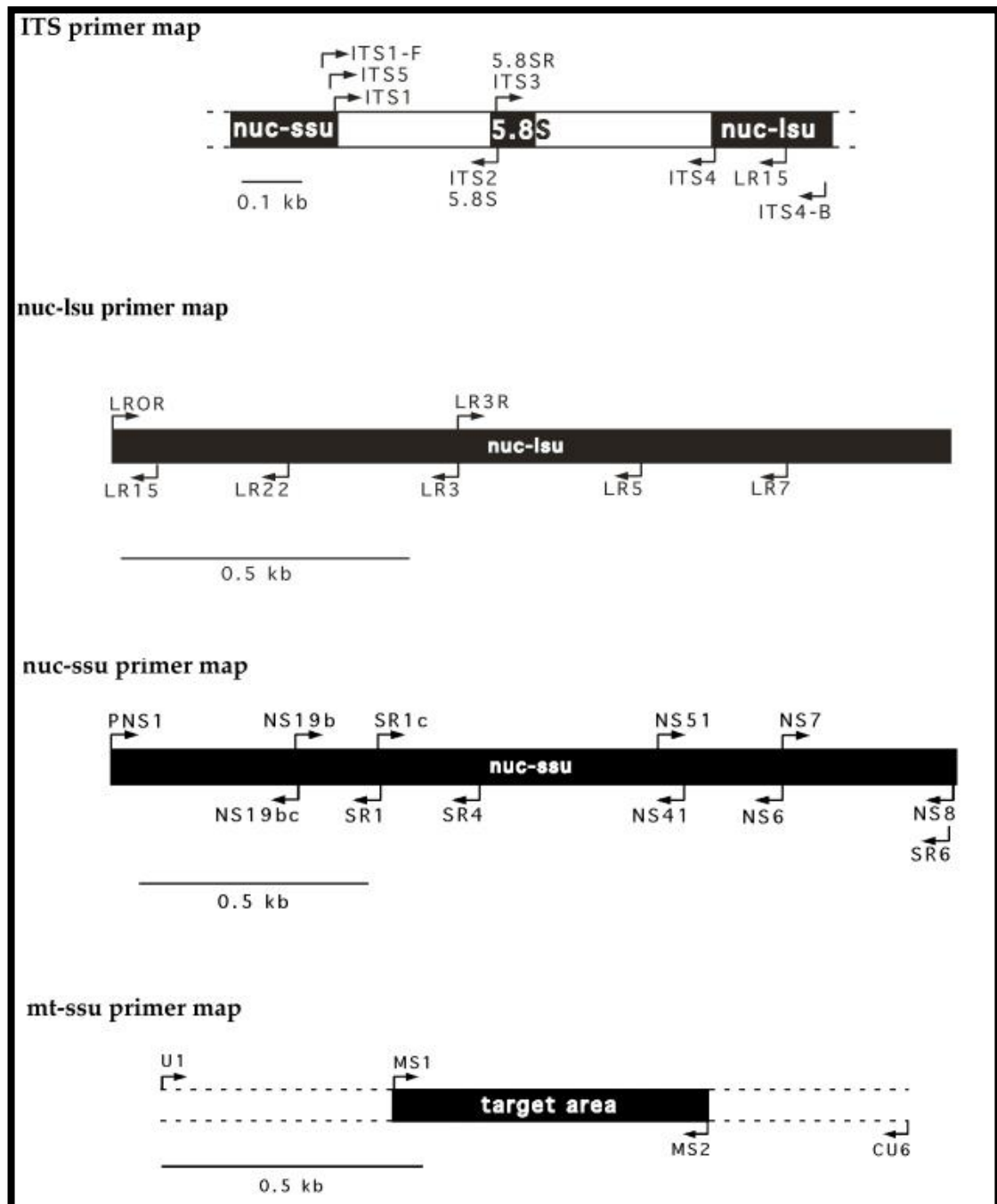


Figure 7 – Détails des marqueurs et des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Source : Hibbett Lab (<http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/>)

II.4 – Amplification des marqueurs par PCR

La PCR (« Polymerase Chain Reaction ») est une réaction enzymatique permettant la répllication *in vitro* d'un fragment spécifique de l'ADN. Dans cette étude, nous amplifions 4 marqueurs : ITS, nuc-LSU, nuc-SSU et mt-SSU (*cf.* Figure 7). Les détails de l'amplification par PCR sont présentés en Annexe 5. Les produits de PCR obtenus sont alors conservés à -20°C dans l'attente de la réalisation des gels de contrôle et de leur envoi pour séquençage. Les échantillons ainsi obtenus ont été soumis à une migration par électrophorèse de 90 minutes (120V, 250 mA) sur gel d'agarose 1% à 102 puits. Chaque puits est chargé de 5 µL de produit PCR auxquels ont été ajoutés 2 µL de bleu de charge « 6xDNA loading ». Nous utilisons également des marqueurs de taille de type *Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix* afin d'obtenir une échelle pour la lecture du gel. Une fois la migration terminée, le gel est révélé dans un bain de bromure d'éthidium (BET, 10 mg/ml), molécule qui s'intercale entre les bases de l'ADN et présente une fluorescence à 590 nm. L'observation sous lumière UV (590 nm) permet d'estimer l'intensité de la réaction de PCR, de vérifier l'intégrité et la taille de nos fragments d'ADN ainsi que leur position exacte dans le gel avant de faire séquençer nos échantillons.

II.5 – Séquençage, traitement, et construction des arbres phylogénétiques

Les produits PCR sont envoyés pour séquençage à la plateforme de génomique du laboratoire AGAP (Montpellier), par la méthode SANGER sur séquenceur capillaire ABI. Une fois les séquences obtenues, nous procédons, par l'intermédiaire de la plateforme bioinformatique SouthGreen Galaxy du CIRAD, à un nettoyage des séquences par le logiciel GBlocks, puis à un alignement multiple pour chacun des marqueurs en utilisant l'algorithme MAFFT. Les séquences ainsi alignées sont ensuite traitées par un modèle GTR (General Time Reversal), se basant sur le maximum de vraisemblance afin de construire un dendrogramme pour chaque groupe de séquences des différents marqueurs étudiés. Nous obtiendrons ainsi 4 arbres phylogénétiques, reconstruits respectivement à l'aide des séquences des marqueurs ITS, nuc-LSU, nuc-SSU et mt-SSU de nos échantillons. Ces arbres seront ensuite assemblés par consensus via le logiciel Super Triplets afin d'obtenir une reconstruction phylogénétique la plus précise possible, combinant les informations fournies par les 3 marqueurs génétiques considérés dans cette étude. Les séquences ITS obtenues feront également l'objet d'une comparaison par BLASTn avec la base de données du NCBI afin d'obtenir une indication concernant l'origine de la ou des séquences de la banque de données NCBI ayant un degré d'homologie le plus élevé possible.

Tableau 3 – Récapitulatif des données relatives aux échantillons collectés en plantations commerciales au Cameroun.

Dibombari		Kienké	
Nombre d'échantillons	18	Nombre d'échantillons	6
Cultures pures	13	Cultures pures	5
Age des palmiers	1974 (8), 1975 (7), 1994 (3)	Age des palmiers	1978 (6)
Génération planting	1ère (15), 2nd (3)	Génération planting	1ère (4), 2nd (2)
Culture précédente	Palmier à huile (3)	Culture précédente	Palmier à huile (2)
Nécrose de la base du stipe	non	Nécrose de la base du stipe	1
Maladies	BSR (16), BSR + Fusariose (2)	Maladies	BSR (1), BSR + Fusariose (2), USR + Fusariose (1), abbatus (2)
Etat des palmiers	vivant (14), mort au sol (4)	Etat des palmiers	mort sur pied (2), mort au sol (4)
Symptômes foliaires	importants (11), médium (2), aucun (1), palmier mort (4)	Symptômes foliaires	palmier mort (6)
Edéa (Ferme suisse)		SAFACAM	
Nombre d'échantillons	10	Nombre d'échantillons	2
Cultures pures	7	Cultures pures	1
Age des palmiers	1979 (4), 1982 (5), 1984 (1)	Age des palmiers	1985 (1)
Génération planting	1ère (10)	Génération planting	1ère (1)
Culture précédente	-	Culture précédente	Hévéa
Nécrose de la base du stipe	non	Nécrose de la base du stipe	non
Maladies	BSR (10)	Maladies	BSR (1)
Etat des palmiers	vivant (10)	Etat des palmiers	mort au sol (1)
Symptômes foliaires	palmier sain (8), légers (2)	Symptômes foliaires	palmier mort (1)
CDC Mungo Estate		Collection du laboratoire de Phytopathologie de Dibombari	
Nombre d'échantillons	7	Nombre d'échantillons	Edéa (3), SAFACAM (4), Kienké (1)
Cultures pures	6	Cultures pures	8
Age des palmiers	1995 (2), 1996 (2)	Origine	Edéa (3), SAFACAM (4), Kienké (1)
Génération planting	2nd (7)	Age des palmiers	1974 (3), 1979 (1), 1981 (1), 1983 (1), 1985 (1) + 1 arbre forestier
Culture précédente	Palmier à huile	Génération planting	-
Nécrose de la base du stipe	non	Culture précédente	-
Maladies	BSR (7)	Nécrose de la base du stipe	-
Etat des palmiers	vivant (7)	Maladies	-
Symptômes foliaires	sain (1), légers (3), moyens (1), importants (2)	Etat des palmiers	-
		Symptômes foliaires	-

III – Résultats

III.1 – Matériel biologique

III.1.1 – Isolats de référence

Les 20 isolats de référence ont été réceptionnés au laboratoire à la fin du mois d'avril 2013. Les cultures se présentent sous la forme d'éprouvettes contenant une gélose inclinée de malt-agar, aux extrémités bouchées par un coton stérile et contenant du mycélium des différents isolats. Après 1 à 2 semaines d'incubation à 28°C, nous avons obtenu pour 5 des 20 isolats (CBS109686, CBS128581, CBS194.76, CBS220.36 et CBS429.84) des cultures saines avec un mycélium vigoureux, tandis que les 15 autres isolats présentaient une croissance mycélienne très lente, ou des contaminations.

III.1.2 – Echantillonnage en plantations

Durant la mission d'échantillonnage en plantation au Cameroun, nous avons pu obtenir 51 échantillons : 43 échantillons de sporophores frais, ainsi que 8 cultures pures déjà en collection au laboratoire provenant également des différents sites étudiés (G11 à G22). A partir des 43 échantillons de sporophores frais, nous avons réussi à obtenir 32 isolats en culture pure sur milieu PDA-C, soit un taux de succès de l'isolement en culture pure à partir de tissus frais de plus de 74%. Après le transfert en tubes Wheaton 8 ml contenant de l'eau stérile, aucune contamination n'a été observée et le taux de reprise de croissance lors du repiquage des fragments de gélose sur milieu PDA-C au laboratoire de l'équipe GFP à Montpellier était de 100%.

Les 43 échantillons de sporophores frais ont fait l'objet d'une fiche de collecte détaillée (cf. Tableau 3). Ainsi, nous avons collecté 18 échantillons de sporophores frais présumés appartenir au genre *Ganoderma* à Dibombari, 6 à Kienké, 10 à Edéa, 2 à SAFACAM et 7 à Mungo Estate. Nous avons pu obtenir des échantillons sur des palmiers âgés de 17 à 39 ans. En considérant les données de collecte disponibles pour 5 des 8 échantillons déjà en collection au laboratoire de phytopathologie de Dibombari, nous avons obtenu 5 échantillons collectés sur des palmiers âgés de 17 ans ; 2 échantillons sur des palmiers âgés de 18 ans ; 4 échantillons sur des palmiers âgés de 19 ans ; 1 échantillon sur des palmiers respectivement âgés de 21, 23 et 27 ans ; 2 échantillons sur des palmiers âgés de 28 ans ; 1 échantillon sur un palmier âgé de 29 ans ; 5 échantillons sur des palmiers âgés de 31 ans, 4 échantillons sur des palmiers âgés de 34 ans ; 4 échantillons sur des palmiers âgés de 35

Tableau 4 - Résultats de spectroanalyse des échantillons d'ADN obtenus lors de la comparaison de méthodes d'extraction d'ADN.

	Doležel-MATAB				ADEMTECH (Lysis 1h)				ADEMTECH (Lysis 2h)			
	tube 1	tube 2	tube 3	mean	tube 1	tube 2	tube 3	mean	tube 1	tube 2	tube 3	mean
Concentration (ng/μL)	359,9	361,8	221,5	314,4	4,1	3,0	5,6	4,2	16,2	13,4	10,4	13,3
Elution volume (μL)	50	50	50	50	60	60	60	60	60	60	60	60
FW (mg)	300	300	300	300	40	40	40	40	40	40	40	40
DNA quantity (μg)	18,00	18,09	11,075	15,72	0,246	0,179	0,333	0,253	0,972	0,804	0,624	0,800
Ratio DNA quantity/FW	0,060	0,060	0,037	0,052	0,006	0,004	0,008	0,006	0,024	0,020	0,016	0,020
A1/A2	1,889	1,853	1,870	1,871	1,511	1,815	1,784	1,703	1,970	1,991	2,200	2,054
A1/A3	0,994	1,030	1,028	1,017	0,171	0,170	0,138	0,160	0,267	0,435	0,218	0,307
A1 (260nm)	1,551	1,496	0,926	1,324	0,015	0,015	0,017	0,016	0,072	0,078	0,027	0,059
A2 (280nm)	1,212	1,163	0,720	1,032	0,012	0,013	0,012	0,012	0,056	0,065	0,016	0,046
A3 (230nm)	1,556	1,475	0,914	1,315	0,056	0,044	0,086	0,062	0,161	0,113	0,270	0,181
	ADEMTECH (Lysis 2h+ nucleus extraction+RNase Free)				ADEMTECH (Lysis 2h+ nucleus extraction+RNase)							
	tube 1	tube 2	tube 3	mean	tube 1	tube 2	tube 3	mean				
Concentration (ng/μL)	10,1	7,08	9,16	8,8	5,49	13,3	5,61	8,1				
Elution volume (μL)	60	60	60	60	60	60	60	60				
FW (mg)	40	40	40	40	40	40	40	40				
DNA quantity (μg)	0,606	0,425	0,550	0,527	0,329	0,798	0,337	0,488				
Ratio DNA quantity/FW	0,015	0,011	0,014	0,013	0,008	0,020	0,008	0,012				
A1/A2	1,813	1,813	1,786	1,804	1,92	1,802	1,764	1,829				
A1/A3	0,414	0,396	0,402	0,404	0,385	0,317	0,337	0,346				
A1 (260nm)	0,687	0,646	0,663	0,665	0,643	0,696	0,636	0,658				
A2 (280nm)	0,678	0,639	0,655	0,657	0,638	0,684	0,631	0,651				
A3 (230nm)	0,715	0,667	0,667	0,683	0,66	0,753	0,658	0,690				

ans ; 10 échantillons sur des palmiers âgés de 38 ans et enfin 8 échantillons sur des palmiers âgés de 39 ans. Les échantillons ont été collectés soit sur des palmiers vivants (31 échantillons), soit morts sur pied (2 échantillons), ou morts au sol (10 échantillons). La gamme de symptômes foliaires observés sur les arbres malades (vivants) ayant fait l'objet d'un échantillonnage est la suivante : palmier sain (10 échantillons), symptômes foliaires légers (5 échantillons), symptômes foliaires intermédiaires (3 échantillons), et enfin, symptômes foliaires importants (13 échantillons). Parmi les 43 échantillons récoltés, 31 provenaient de blocs de plantations en première génération de culture, et 12 de blocs en seconde génération (3 à Dibombari, 2 à Kienké et 7 de Mungo Estate). Un échantillon, KKGf05, a toutefois été collecté à plus de 3 mètres du sol sur un palmier mort sur pied atteint de fusariose.

III.1.3 – Caractérisation morpho-anatomique

Le sporophore DBGF10bis appartient à une espèce porée, et la trame est colorée. Ce champignon se présente sous forme de consoles semi-circulaires à zones concentriques, et est largement fixé au palmier à huile (*cf.* Annexe 6). Le chapeau (croûte) est de 50 mm de largeur. Il est légèrement bosselé et a un vernis (ou résine, ou laque) caractéristique de *Ganoderma* avec de belles couleurs brillantes « brun rouille, acajou ». La marge est rouge brique à bord clair orangé. La chair, ou trame, du sporophore est colorée en brun et est ligneuse. Il est amyloïde avec le réactif de Mezler. Les analyses en microscopie sont très caractéristiques du *Ganoderma* :

- Les spores sont ovales, allongées et tronquées oblongues et finement échinulées ;
- La structure de la chair est trimitique (Il a trois types d'hyphes) :
 - * hyphes conjonctifs, bruns à paroi épaisse, ramifiés (en arbuscule) ;
 - * hyphes squelettiques, bruns à paroi épaisse ;
 - * hyphes générateurs, cloisonnés et bouclés.
- Il y a des zones où des conidiophores fabriquent des conidies ;
- Les basides sont des éléments globuleux, et très courtes ; quand les basides disparaissent, elles se collent à la paroi de la trame.

Cette caractérisation complètera et confirmera les résultats obtenus lors des analyses moléculaires des échantillons.

Tableau 5 - Résultats de spectrophotanalyse des extraits d'ADN des échantillons de *Ganoderma* spp.

Echantillon	Type	A1/A2	A1/A3	DNA (ng)
DBGF09	sporophore	2,34	2,28	11 957
EDGF05	sporophore	2,31	2,16	14 717
EDGF08	sporophore	2,18	1,82	40 238
MGGF07	sporophore	-	-	641
SFGF01	sporophore	2,12	0,89	1 562
DBGF11	sporophore	3,85	2,50	891
CBS 109686	PDA+film	1,98	0,73	33 565
CBS 128581	PDA+film	1,96	0,76	31 229
CBS 194.76	PDA+film	1,87	0,64	34 208
CBS 220.36	PDA+film	1,91	0,70	21 091
CBS 429.84	PDA+film	1,97	0,76	18 557
DBGF01	PDA+film	1,81	0,52	12 848
DBGF02	PDA+film	1,79	0,52	11 023
DBGF03	PDA+film	1,81	0,57	29 750
DBGF03bis	PDA+film	1,81	0,54	19 345
DBGF04	PDA+film	1,79	0,59	53 027
DBGF05	PDA+film	1,85	0,54	7 114
DBGF08	PDA+film	1,87	0,72	21 331
DBGF10	PDA+film	1,83	0,51	11 904
DBGF12	PDA+film	1,75	0,49	14 688
DBGF12bis	PDA+film	1,82	0,53	19 812
DBGF14	PDA+film	1,9	0,65	24 805
DBGF14bis	PDA+film	1,81	0,53	33 084
EDGF01	PDA+film	1,75	0,49	5 373
EDGF02	PDA+film	1,90	0,65	33 084

Echantillon	Type	A1/A2	A1/A3	DNA (ng)
EDGF03	PDA+film	1,79	0,59	34 954
EDGF04	PDA+film	1,86	0,72	71 087
EDGF07	PDA+film	1,85	0,58	27 769
EDGF08bis	PDA+film	1,74	0,49	3 329
EDGF09	PDA+film	1,70	0,57	4 497
G11	PDA+film	2,03	1,30	19 798
G12	PDA+film	1,45	0,60	2 905
G14	PDA+film	1,94	0,68	16 235
G16	PDA+film	1,82	0,57	26 222
G17	PDA+film	1,87	0,59	25 651
G19	PDA+film	1,58	0,45	873
G21	PDA+film	1,83	0,57	1 913
G22	PDA+film	1,8	0,63	20 849
KKGF01	PDA+film	1,84	0,54	7 125
KKGF02	PDA+film	1,73	0,52	37 493
KKGF03	PDA+film	1,72	0,52	44 107
KKGF04	PDA+film	2,09	0,89	1 042
KKGF04bis	PDA+film	1,66	0,52	37 848
KKGF05	PDA+film	1,80	0,60	32 762
MGGF01	PDA+film	1,95	0,71	47 830
MGGF02	PDA+film	1,84	0,53	27 959
MGGF03	PDA+film	1,74	0,55	37 420
MGGF04	PDA+film	1,56	0,48	1 390
MGGF05	PDA+film	1,82	0,50	3 650
MGGF06	PDA+film	1,92	0,66	37 493
SFGF01bis	PDA+film	2,11	1,41	46 063

III.2 – Extraction d'ADN

III.2.1 – Comparaison de méthodes

Les résultats de la comparaison de méthodes d'extraction d'ADN sont présentés dans le Tableau 4. Les critères décisifs pour le choix de la méthode sont des ratios A1/A2 et A1/A3 se rapprochant d'une valeur de 1,8, ainsi qu'une concentration finale d'ADN satisfaisante. Nous observons ici que la méthode *Doležel*-MATAB nous a permis d'obtenir une concentration moyenne de 314,4 ng.µL, un ratio A1/A2 moyen de 1,87 et A1/A3 de 1,017. En comparaison, les différentes optimisations avec le kit AdemTech nous permettent d'obtenir une concentration d'ADN moyenne s'échelonnant de 4,2 ng.µL à 13,3 ng.µL (moyenne : 8,6 ng.µL). Les ratios A1/A2 moyens obtenus varient entre 1,70 et 2,05 (moyenne : 1,85) ; les ratios moyens A1/A3 entre 0,16 et 0,40 (moyenne : 0,30).

Des ratios de quantité d'ADN obtenue par rapport à la quantité de matière fraîche utilisée ont été établis afin de mieux rendre compte de l'efficacité de la méthode, car la quantité de matière fraîche utilisée varie entre la méthode *Doležel*-MATAB et le kit AdemTech. Ainsi, les échantillons extraits par la méthode *Doležel*-MATAB présentent un ratio moyen de 0,052, tandis que les échantillons obtenus par les protocoles utilisant le kit AdemTech présentent des ratios variant entre 0,006 et 0,020 (moyenne : 0,013). Ainsi, la méthode *Doležel*-MATAB présente un rendement 4 fois supérieur à la méthode utilisant le kit AdemTech.

La vérification de l'intégrité des ADN par électrophorèse sur gel d'agarose 1% laisse apparaître des bandes uniques à la fluorescence forte pour les 3 échantillons extraits par la méthode *Doležel*-MATAB. Les 3 échantillons extraits *via* le kit AdemTech en suivant le protocole de 1h de lyse ne sont pas observables sur le gel. Les 9 autres échantillons extraits *via* le kit AdemTech en suivant les protocoles de (1) 2h de lyse, (2) 2h de lyse avec extraction des noyaux sans RNase, et (3) 2h de lyse avec extraction des noyaux avec RNase, présentent des bandes uniques mais à faible fluorescence. Ces observations sont congruentes avec les quantifications d'ADN de nos échantillons.

III.2.2 – Extraction d'ADN des échantillons

Nous avons réalisé l'extraction d'ADN par la méthode *Doležel*-MATAB de :

- 5 isolats de référence du CBS en culture pure sur PDA-Chloramphénicol avec film de nitrocellulose
- 32 isolats du Cameroun en culture pure sur PDA-Chloramphénicol avec film de nitrocellulose

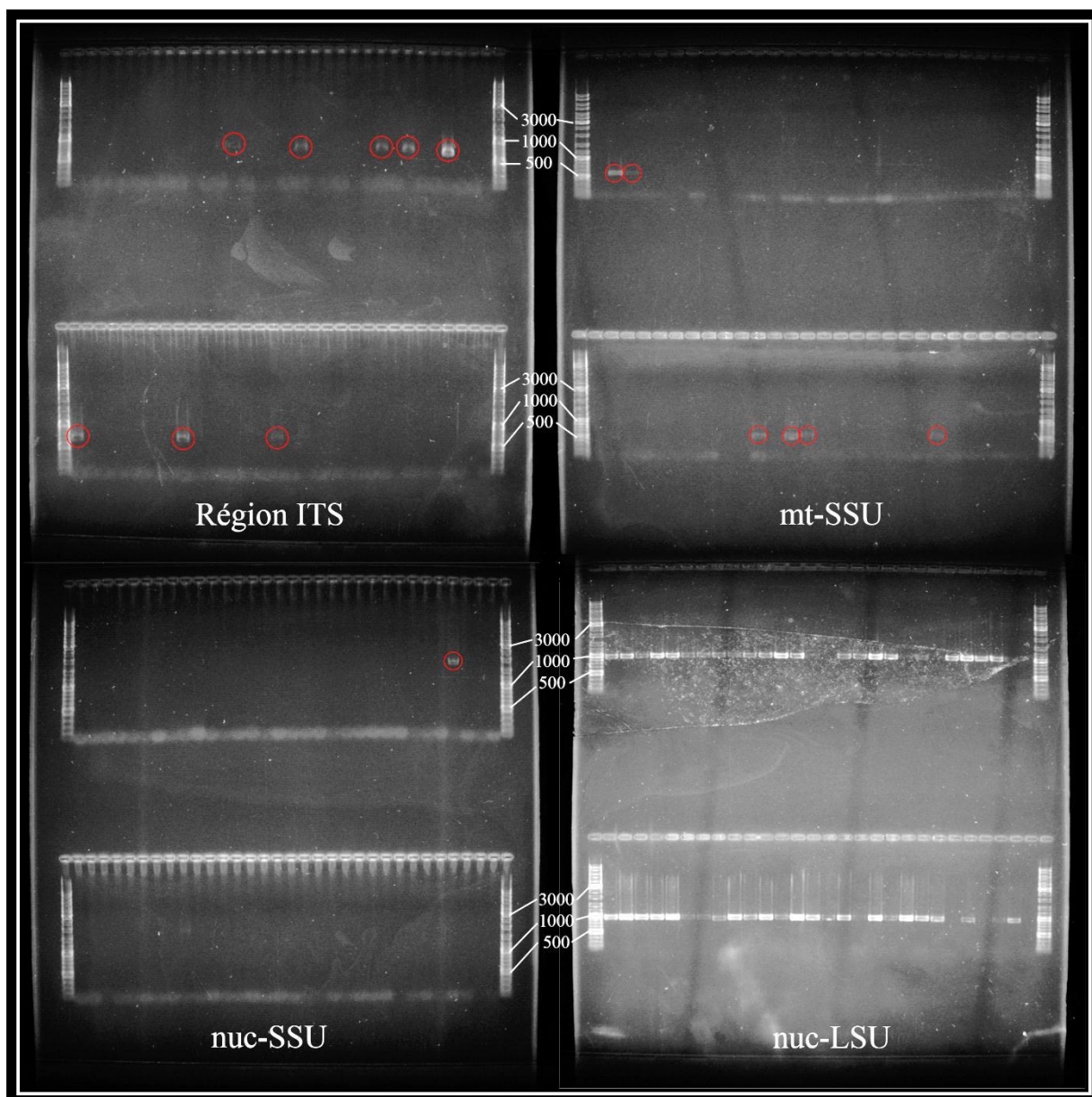


Figure 8 – Exemples de produits PCR sur gel d'agarose 1% après électrophorèse.

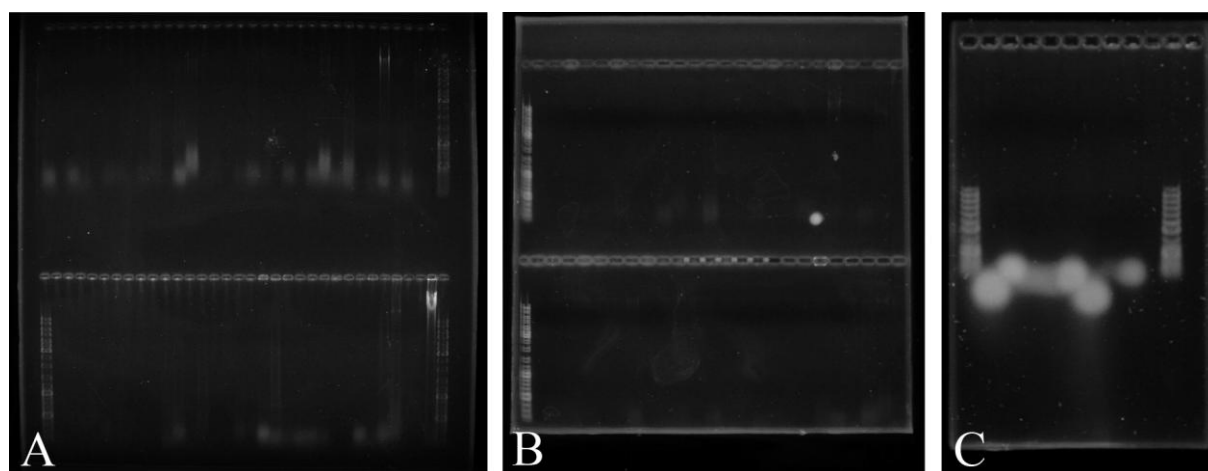


Figure 9 – (A) ADN stock, (B) ADN à 5 ng.µL⁻¹ et (C) amorces nucléotidiques sur gel d'agarose 1% après électrophorèse.

- 6 sporophores d'échantillons du Cameroun pour lesquels nous n'avons pas pu obtenir de culture pure
- 8 isolats du Cameroun en culture pure sur PDA-Chloramphénicol avec film de nitrocellulose issus de la collection du laboratoire de phytopathologie de Dibombari

Après analyse de nos 51 échantillons d'ADN par spectrophotométrie, nous obtenons une quantité d'ADN moyenne par échantillon de 22,04 mg. Le ratio A1/A2 moyen mesuré est de 1,86 ; le ratio A1/A3 moyen mesuré est de 0,74.

Pour les 45 échantillons d'ADN issus de mycélium en culture pure sur film de nitrocellulose, la quantité moyenne d'ADN par échantillon est de 23,42 mg. Les ratios moyens A1/A2 et A1/A3 mesurés sont respectivement de 1,83 et 0,63.

Pour les 6 échantillons d'ADN issus de tissus de l'hyménophore des sporophores récoltés, la quantité moyenne d'ADN par échantillon est de 11,67 mg. Les ratios moyens A1/A2 et A1/A3 mesurés sont respectivement de 2,13 et 1,61.

Les résultats de spectroanalyse de l'ensemble des échantillons d'ADN obtenus sont présentés en détail dans le Tableau 5.

III.3 – Amplification des marqueurs par PCR

Après amplification des marqueurs de nos échantillons par PCR, les produits de la réaction de polymérisation ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Pour les marqueurs ITS, mt-SSU et nuc-SSU, les résultats des amplifications par PCR montrent que seules quelques bandes sont observables sur les différents gels (*cf.* Figure 8). Toutefois, hormis 7 échantillons, l'ensemble des produits de PCR pour l'amplification de nuc-LSU présentent une bande nette de la taille attendue (900 pb environ) sur le gel d'agarose.

Au vu des premiers résultats peu satisfaisant pour la région ITS et les marqueurs mt-SSU et nuc-SSU, nous avons décidé de réaliser une seconde PCR pour l'amplification de la région ITS et nuc-SSU en adaptant les températures d'hybridation du programme du thermocycleur aux primers utilisés. Nous avons décidé de ne plus considérer le marqueur mt-SSU dans cette étude, car nous soupçonnons que la qualité des extraits d'ADN soit à l'origine du problème. De ce fait, l'ADN mitochondrial, plus difficile à extraire et moins abondant, serait en quantité insuffisante pour l'amplification; nous préférons donc essayer d'obtenir d'avantage de résultats positifs pour le marqueur nuc-SSU au vu de l'unique échantillon amplifié avec succès lors de la première réaction de PCR. Malgré un programme d'amplification plus ciblé, les résultats sont encore une fois assez hétérogènes.

En considérant les résultats des deux amplifications par PCR réalisées, nous observons que seuls 10 des produits de PCR pour l'amplification de la région ITS présentent une bande observable de la taille attendue (700 pb environ) sur le gel d'agarose. De même, nous observons qu'un seul des produits de PCR pour l'amplification de nuc-SSU présente une bande difficilement observable, mais là encore de la taille attendue (1800 pb environ). Il en va de même pour mt-SSU : seuls 6 des produits de PCR présentent une bande observable de la taille attendue (500 pb environ) sur le gel. Enfin, hormis quelques exceptions, l'ensemble des produits de PCR pour l'amplification de nuc-LSU présentent une bande nette de la taille attendue (900 pb environ) sur le gel d'agarose.

Afin d'identifier la cause de l'échec partiel de nos amplifications par PCR, nous avons décidé de vérifier l'intégrité de nos échantillons en réalisant une électrophorèse sur gel d'agarose 1% avec les extraits d'ADN des échantillons de *Ganoderma*. Nous avons également réalisé une électrophorèse des ADN dilués à $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ utilisés lors de la préparation du mélange réactionnel des deux séries de PCR. Enfin, les oligonucléotides utilisés comme amorces dans nos réactions de PCR ont également fait l'objet d'une migration sur gel d'agarose. Nous observons que l'ensemble de nos ADN présente un « smear » (bandes à l'aspect diffus) important (*cf.* Figure 9). Nous observons le même phénomène pour les échantillons d'ADN dilués à $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Les amorces présentent quant à elles un profil satisfaisant sur le gel ainsi qu'une taille correcte, malgré un signal fluorescent diffus.

III.4 - Séquençage, traitement et construction des arbres phylogénétiques

En raison des anomalies constatées lors des phases d'amplification des marqueurs par PCR, et du retard dû à la mise au point et à la réalisation d'une seconde série de réactions d'amplification, le séquençage des échantillons est toujours en cours. Les résultats seront présentés lorsqu'ils sont disponibles et feront l'objet d'une annexe écrite complémentaire à ce rapport.

IV - Discussion

IV.1 – Obtention du matériel biologique

Lors de la recherche d'isolats de *Ganoderma spp.* de référence, nous avons passé au crible 7 banques fongiques : CBS-KNAW, LGC Standards, CCBAS, CABI, WDCM, la souchothèque de Bretagne et BCCM/MUCL. Nous avons pu constater que bien souvent, les isolats référencés ne disposaient pas des informations détaillées de collecte, telles que l'arbre hôte ou le lieu précis de récolte. De plus, beaucoup des isolats présentaient un prix trop élevé pour nous permettre de centraliser une collection exhaustive au laboratoire. Nous constatons également que seules 63 espèces de *Ganoderma* étaient représentées dans les collections fongiques, parmi près de 250 espèces connues que comporte le genre *Ganoderma*. Ainsi, nous avons restreint notre choix à 17 espèces, que nous avons identifiées comme les plus représentatives de la diversité génétique du genre *Ganoderma* parmi les isolats disponibles.

L'obtention de matériel biologique frais sur le terrain a également été une étape cruciale de ce travail. Le grand avantage du dispositif de terrain mis à notre disposition par PalmElit et la SOCAPALM a été la possibilité d'avoir accès au laboratoire de phytopathologie au sein de la plantation de Dibombari au Cameroun. Ainsi, il a été possible d'avoir accès au matériel nous permettant de réaliser la mise en culture et la purification des isolats obtenus à partir des échantillons collectés sur les différents sites de la SOCAPALM. Cela nous a permis d'obtenir un matériel biologique d'excellente qualité, exempt de contaminants biologiques, et multipliable en laboratoire afin de disposer de tissus frais pour les étapes ultérieures du projet de recherche. Ainsi, l'obtention de 51 isolats en culture pure nous a permis de renforcer la collection d'isolats de *Ganoderma spp.* déjà présente au laboratoire de l'équipe GFP à Montpellier, tous en participant à la stratégie de recherche et d'innovation de l'entreprise partenaire PalmElit. En effet, cette mission leur permet l'accès à un matériel biologique vivant collecté en plantation en Afrique, notamment pour la réalisation de tests d'évaluation précoce à la tolérance au *Ganoderma* de différents croisements de *E. guineensis* dans le but d'identifier un matériel végétal adapté aux contraintes biologiques des sites étudiés. Nous sommes particulièrement satisfaits d'avoir pu collecter autant d'échantillons représentant une large gamme de conditions biologiques et écologiques. Ainsi, nous avons pu obtenir des échantillons sur des arbres relativement jeunes et plus âgés, sur des arbres asymptomatiques ou bien totalement nécrosés par la pourriture du stipe, ou bien encore sur des arbres en première ou en seconde génération de culture. Cela est particulièrement intéressant, car bien représentatif des différentes conditions d'infection rencontrées dans les

différents sites d'échantillonnage. La diversité dans le profil des isolats collectés illustre notamment les différentes conditions de l'infection par ce phytopathogène en Afrique et en Asie du Sud-Est, ce qui renforce nos motivations à mieux caractériser l'étiologie de ce pathosystème en Afrique. Ce travail de collecte permettra également d'évaluer les éventuelles différences d'agressivité entre les isolats récoltés dans ces 5 plantations, notamment par des études de transcriptomique et d'enzymologie démarrées au laboratoire en 2013.

IV.2 – Préparation des isolats

IV.2.1 – Isolats de référence

Seuls 5 des 20 isolats ont présenté une reprise de croissance vigoureuse sur milieu PDA-chloramphénicol. Nous estimons que, outre les différences inhérentes aux différentes espèces étudiées, cela pourrait être dû au mode de conservation des isolats au laboratoire du CBS-KNAW. En effet, les isolats sont conservés sous forme de cultures lyophilisées et cryo-préservées. Ainsi, malgré les contrôles de viabilité des cultures imposés par le statut de « International Depository Authority » du CBS, il se peut que les cultures régénérées à partir des stocks cryo-préservés présentent un développement mycélien plus lent qu'une culture récente. De ce fait, par manque de temps, nous avons restreint les isolats de référence considérés dans cette étude aux 5 isolats présentant une croissance satisfaisante.

IV.2.2 – Isolats du Cameroun

Dans nos conditions expérimentales, le protocole utilisé est efficace car le taux de réussite de mise en culture et de purification des isolats est de plus de 74% (32 isolats pour 43 échantillons). Nous avons observé que pour 7 des 11 échantillons n'ayant pas permis l'obtention d'une culture pure, les sporophores étaient particulièrement anciens et souvent secs. Pour ces échantillons, nous n'observions pas de développement de mycélium lors de la première phase de purification sur le milieu de sélection water-agar-chloramphénicol-streptomycine. Ainsi, nous supposons que les tissus internes du sporophore étaient trop déshydratés ou anciens pour permettre une reprise de croissance. Pour les 4 autres échantillons, l'échec de la purification de souche était dû à des contaminations des milieux de culture, probablement véhiculées par les fragments d'hyménophore utilisés.

IV.2.3 – Caractérisation morpho-anatomique

La caractérisation morpho-anatomique réalisée au Museum National d'Histoire Naturelle par M. Bernard Duhem et à l'Université de Lille par M. Stéphane Welti nous a conforté quant à

l'identité des échantillons collectés. Il s'agit bien de spécimens présentant les caractéristiques du genre *Ganoderma*, présentant toutefois une morphologie et une anatomie différente du *G. boninense* observé sur *E. guineensis* à Sumatra en Indonésie selon la systématique de Patouillard (1887).

IV.3 – Extraction d'ADN

La comparaison de méthodes nous a permis de déterminer que la méthode *Doležel-MATAB* était la plus adaptée à l'extraction de l'ADN fongique. Que ce soit en termes de pureté de l'échantillon (ratios A1/A2 et A1/A3 satisfaisants), de concentration finale de l'ADN ou bien de l'intégrité de ce dernier, il se positionne comme le plus efficace. De plus, la possibilité de multiplier le matériel biologique nous permet d'extraire de grandes quantités d'ADN afin de réaliser un stock mère pour les différentes expériences ultérieures et la thèse de doctorat-CIFRE.

Pour la majorité de nos échantillons, l'extraction d'ADN a été très satisfaisante en termes de pureté et de concentration finale. Toutefois, l'analyse sur gel d'agarose des produits d'extraction laisse apparaître ce qui semble être une détérioration de l'ADN, ainsi qu'une forte contamination par les polysaccharides des tissus fongiques (Carlyle *et al.*, 2001), contrairement à ce que nous avons pu observer préalablement lors de la comparaison de méthodes. Nous suspectons une interférence des polysaccharides lors de l'extraction d'ADN et de son analyse en spectrophotométrie, ayant créé des artefacts impactant la quantité et la qualité réelle de l'ADN mesuré.

IV.4 – Amplification des marqueurs par PCR

Du fait de la mauvaise qualité des extraits d'ADN, les résultats non concluants s'expliquent aisément : seuls les échantillons ayant pu être observés sur gel présentent une amplification satisfaisante. D'autre part, l'amplification réussie du marqueur nuc-LSU sur la majorité des échantillons est probablement due à la fois à la présence d'ADN à l'état de traces, mais également aux caractéristiques des primers utilisés : température d'hybridation identique, oligonucléotides courts, et taux de GC modéré et homogène (*cf.* Annexe 5) ; de ce fait, l'amplification est facilitée, contrairement aux oligonucléotides utilisés pour les autres marqueurs qui rendent l'amplification par PCR difficile, d'autant plus lorsque la matrice ADN est de qualité limitée. Ainsi, il conviendra soit d'améliorer la qualité de nos extraits d'ADN (notamment pour l'ADN mitochondrial), soit de dessiner de nouvelles amorces, afin de faciliter les amplifications complexes des marqueurs ITS, nuc-SSU et mt-SSU par PCR.

IV – Conclusion

Ce projet de recherche s'inscrit dans la volonté de répondre à une problématique nouvelle en Afrique subtropicale, l'émergence de la pourriture basale du stipe en plantation de palmier à huile. Ce travail se destine également à élargir les connaissances sur les pathogènes fongiques du genre *Ganoderma*. Ainsi, cette étude permet de valider les protocoles d'échantillonnage et d'isolement en culture pure, à partir de matériel frais de fructifications fongiques collectées sur le stipe des palmiers infectés dans les plantations du Cameroun. Le taux de réussite de purification en culture pure des isolats de plus de 74% nous permet de nous assurer de la possibilité d'obtenir un matériel biologique de qualité, pur et multipliable en laboratoire, pour la réalisation d'études moléculaires ultérieures. La caractérisation morpho-anatomique des échantillons collectés en plantation au Cameroun nous a permis de mettre en évidence la présence d'espèces appartenant au genre *Ganoderma*, mais toutefois différentes lorsqu'on les compare aux individus de *G. boninense* observés en plantation à Sumatra en Indonésie. Il s'agit d'un résultat très intéressant, illustrant un profil d'émergence de l'infection par les individus du genre *Ganoderma* qui paraît différente au Cameroun et en Asie du Sud-est ; ces résultats confirment la pertinence de cette étude. La large gamme de symptômes des palmiers infectés par les individus du genre *Ganoderma*, ayant fait l'objet d'un compte rendu très exhaustif au sein des 5 plantations étudiées, est également un indicateur de l'agressivité variable des isolats collectés. Cela illustre que, contrairement à la péninsule indonésienne où la majorité des isolats sur *E. guineensis* sont très agressifs, nous sommes au Cameroun dans un cas de figure où la dominance d'une espèce aux traits très pathogènes ne semble pas encore établie. Ainsi, l'étude de la diversité géographique et génétique des individus de *Ganoderma spp.* échantillonnés au Cameroun est particulièrement pertinente pour mieux comprendre les mécanismes d'émergence ainsi que la structuration spatiale et génétique de ce phytopathogène. En revanche, les études moléculaires mises en œuvre au laboratoire nécessitent encore une phase d'optimisation avant de pouvoir être réalisées à plus haut débit.

Il convient de noter qu'au cours de mon stage, les résultats ont fait l'objet de multiples réflexions et ont abouti à la co-construction d'un projet de recherche dans le cadre d'une thèse-CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche) entre l'équipe GFP-AGAP (CIRAD) et la société PalmElit. Ce travail de thèse poursuivra l'optimisation des protocoles et des études sur la diversité génétique des champignons du genre *Ganoderma* responsables de la pourriture basale du stipe en plantation de palmier à huile en Afrique.

Bibliographie

- Adaskaveg JE, Gilbertson RL. 1994. Wood decay caused by *Ganoderma* species in the *G. lucidum* complex. In: Buchanan PK, Hseu RS, Moncalvo JM, eds. *Ganoderma: systematics, phytopathology and pharmacology*. Proceedings of contributed symposium 59A, B, 5th International Mycological Congress. Vancouver, August 14–21, 1994. pp. 79–93.
- Ariffin D, Idris AS, Singh G. 2000. Status of *Ganoderma* in oil palm. In: Flood, J., Bridge, PD, Holderness, M. (Eds.), *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 49–68.
- Carlyle MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. *The Fungi*. Second edition, Academic Press, San Diego, CA.
- Darmono TW, 2000. *Ganoderma* in oil palm in Indonesia: current status and prospective use of antibodies for the detection of infection. In: Flood, J., Bridge, P.D., Holderness, M. (Eds.), *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 249–266.
- FAO 2013. FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/home/index.html#HOME>. 31/01/2013.
- Flood J, Hasan Y. 2004. Basal stem rot - taxonomy, biology, epidemiology, economic status and control in South East Asia and Pacific Islands. Proceedings of the Malaysian Palm Oil Board Conference. MPOB, Kuala Lumpur, Malaysia, May 2004. pp. 117-33.
- Gottlieb AM, Wright JE. 1999. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103, 661–673.
- Hong SG, Jung HS. 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 96(4), 742-755.
- Idris AS. 1999. Basal Stem Rot (BSR) of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Malaysia: Factors Associated with Variation in Disease Severity. Ph.D thesis, Wye College, University of London, UK.
- Idris AS, Ariffin D. 2004. Basal stem rot – biology, detection and control. Invited paper presented at the international conference on “Pest and Diseases of Importance to the Oil Palm Industry”, 18-19 May 2004, Kuala Lumpur. Organized by MPOB, Bangi. pp. 34.

- Kinge TR, Mih AM, Coetzee MPA. 2012. Phylogenetic relationships among species of *Ganoderma* (*Ganodermataceae*, *Basidiomycota*) from Cameroon. *Australian Journal of Botany* 60, 526–538.
- Latifah Z, Harikrishna K, Tan SG, Abdullah F, Ho YW. 2002. Restriction analysis and sequencing of the ITS regions and 5.8S gene of rDNA of *Ganoderma* isolates from infected oil palm and coconut stumps in Malaysia. *Annals of Applied Biology* 141, 133-142.
- Lecoeur E. 2013. Collecte d'échantillons de sporophores de *Ganoderma spp.* en plantation au Cameroun. Compte-rendu confidentiel, PalmElit.
- Miller RNG, Holderness M, Bridge PD, Paterson RRM, Sariah M, Hussin MZ, Hilsley EJ. 1994. A multi-disciplinary approach to the characterization of *Ganoderma* in oil-palm cropping systems. In: Buchanan PK, Hseu RS, Moncalvo JM, eds. *Ganoderma: systematics, phytopathology and pharmacology*. Proceedings of contributed symposium 59A, B, 5th International Mycological Congress. Vancouver, August 14–21, 1994. pp. 57–66.
- Miller RNG, Holderness M, Bridge PD, Chung GF, Zakaria MH. 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. *Plant Pathology* 48, 595–603.
- Miller RNG, Holderness M, Bridge PD. 2000. Molecular and morphological characterization of *Ganoderma* in oil-palm plantings. In: Flood, J., Bridge, P.D., Holderness, M. (Eds.), *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 159–182.
- Moncalvo JM, Wang HF *et al.* 1995. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research* 99, 1489-1499.
- Moncalvo JM. 2000. Systematics of *Ganoderma*. In: Flood, J, Bridge, PD, Holderness, M. (Eds.), *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 23–45.
- Patouillard, NT. 1887. (*G.lucidum* var.). *Journal de Botanique*.
- Paterson RRM. 2007. *Ganoderma* disease of oil palm - A white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Protection*, 26(9), 1369-1376.

- Pilotti CA, Sanderson FR, Aitken EAB. 2003. Genetic structure of a population of *Ganoderma boninense* on oil palm. *Plant Pathology* 52, 455–463.
- Ryvarden L. 1995. Can we trust morphology in *Ganoderma*? Proceedings of Contributed Symposium, 59A, B 5th International Mycological Congress (eds. PK Buchanan, RS Hseu and JM Moncalvo). pp. 19–24.
- Sanderson FR, Pilotti CA, Bridge PD. 2000. Basidiospores: their influence on our thinking regarding a control strategy for basal stem rot. In: Flood, J, Bridge, PD, Holderness, M (Eds.), *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 113–119.
- Soepena H, Purba RY, Pawirosukarto S. 2000. A control strategy for basal stem rot (*Ganoderma*) on oil palm. In: Flood, J., Bridge, PD, Holderness, M (Eds.), *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 83–88.
- Turner, PD. 1981. *Oil Palm Diseases and Disorders*. Oxford, New York: Melbourne Oxford University Press.
- Utomo C, Niepold F. 2000. Development of Diagnostic Methods for Detecting *Ganoderma*-infected Oil Palms. *Journal of Phytopathology*, 148, 507–514.
- Welti S. 2009. Recherches de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores récoltés dans les îles françaises des petites Antilles et contribution à l'inventaire des *Ganodermataceae* de Martinique, Guadeloupe et dépendances. Ph.D Thesis, Université du Droit et de la Santé - Lille II, France.
- Zaremski A, De Franqueville H, Breton F. 2013. Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et identification précoce des champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense* : rapport du projet GANODIV : 12 Janvier 2013. Montpellier : CIRAD, 29 p.

Annexe 1 : Présentation du laboratoire d'accueil

Ce stage s'est déroulé pour partie dans le laboratoire de l'équipe GFP de l'UMR AGAP (Amélioration Génétique et Adaptations des Plantes méditerranéenne et Tropicale) du département BIOS du CIRAD. AGAP est une Unité Mixte de Recherche (UMR) qui regroupe des moyens du CIRAD, de l'INRA et de SupAgro. Le directeur est Jean-Christophe Glaszmann et les directeurs adjoints sont Robert Domaingue, Emmanuel Guiderdoni, Sylvie Lewicki Dhainaut et Patrice This.

L'UMR AGAP est composée de 13 équipes : Amélioration des Plantes à Multiplication Végétative, Architecture et Fonctionnement des Espèces Fruitières, Biologie cellulaire de la réponse au stress abiotiques et biotiques chez les espèces pérennes, Développement Adaptatif du Riz, Diversité et Adaptation de la Vigne et des Espèces Méditerranéennes, Evaluation, Gestion et Valorisation des ressources génétiques, Génétique et amélioration des espèces pérennes : modèles Forêt et Palmier, Génétique et Innovation Variétale, Génome et Sélection, Intégration de Données, Plasticité phénotypique et Adaptation des Monocotylédones, Structure et Evolution des Génomes, Virtual Plants.

L'équipe dont dépend ce stage est l'équipe Génétique et amélioration des espèces pérennes : modèles Forêt et Palmier dirigée par Jean-Marc Bouvet ; l'encadrant de stage est le Dr. Alba Zaremski. L'équipe AGAP-GFP travaille également en collaboration avec le Dr. Marc Ducousso du laboratoire LSTM, dont le directeur est M. Michel Lebrun.

Ce stage s'est également déroulé en partie sur les dispositifs de terrain de la société PalmElit SAS, avec le soutien logistique de leur partenaire SOCAPALM. La société PalmElit est une filière du CIRAD, spécialisée dans l'amélioration génétique du palmier à huile, et l'un principaux producteurs mondiaux de semences de variétés améliorées. Les enjeux scientifiques et économiques de ce travail sont particulièrement prononcés, du fait de l'impact des pathogènes sur le rendement brut des producteurs. Le capital est divisé en 1) 66% CIRAD, et 2) 34% Sofiproteol. Son directeur exécutif est M. Christian Picasso, et le rôle de directeur scientifique est assuré par M. Tristan Durand-Gasselin. L'équipe GFP travaille en collaboration avec M. Hubert de Franqueville, phytopathologiste du palmier à huile.

La SOCAPALM, dirigée par M. Jean-Pierre Charbon, est une filiale camerounaise dont l'actionnaire majoritaire à 65% est la société holding PALMCAM. Cette dernière est elle-même une filiale détenue à 100% par la société holding SOCFINAF, elle-même détenue à 63% par le groupe international SOCFIN. La SOCAPALM est le principal planteur de palmier à huile au Cameroun avec plus de 75 000 Ha cultivés, et présente une capitalisation boursière de près de €100 millions en 2012.



GANODERMA SAMPLING



1. SAMPLING PROTOCOL

Identify the oil palms attacked by *Ganoderma* in the plantation, based on the sanitary census and the field observations of *Ganoderma* disease's symptoms:



- Dry leaves falling around the stem
- Basal stem rot
- Fruiting bodies on the stem

Warning

The symptoms aren't always mandatory, and can appear independantly from each other!

For each sample, please fill in the details on the sampling record and take pictures of:

- The whole oil palm tree
- External and internal symptoms
- The fruiting body, before and after sampling
- The fruiting body, in the referenced bag

When possible, sample two fruiting bodies on the same tree. It is important to choose the fruiting bodies as **fresh and thick** as possible (thickness > 2cm if possible). Use a clean blade in order to split the fruiting body from the stem of the oil palm by **cutting the wood around the basis of the sporocarp**. Be careful to label and reference every sample. Brush away the dirt and other possible contaminants, and put the fruiting body in a sealed plastic bag.

The reference number of the sample will be as following: **Two letters indicating the plantation site** (for instance, DB will refer to Dibombari or SF to SAFACAM). Those will be followed by the mention **GF**, standing for « Fresh *Ganoderma* », and then by the **year of sampling** (for instance 2013) and the **number of the sample**. For instance, for a first fruiting body sampled in Dibombari in 2013, the reference number will be DBGF-2013-01. If

several fruiting bodies are collected on the same oil palm, the second one will have the same reference number, but specified as « **bis** » (for instance, DBGF-2013-01bis). Bring back the sample to the laboratory and **keep it in the dark at a cold temperature (4°C – 39°F)** until the strain isolation (**2 days maximum** after sampling).

Sampling of *Ganoderma* isolates: technical information

Isolate name:

Company: SOCAPALM

Name of estate: ☐ Dibombari ☐ Edéa ☐ Safacam ☐ Kienké

Division number:

Field code:

Bloc number / Plot number:

Row number:

Palm Number:

GPS details:

Palm planting generation: ☐ 1st ☐ 2nd ☐ 3rd ☐ 4th

Date of planting:

Progenies:

Previous culture:

Palm disease: ☐ BSR ☐ USR ☐ *Fusarium*

Isolate from*: ☐ spores ☐ FBS ☐ stem ☐ root ☐ soil

Age of Palm:

State of palm: ☐ alive ☐ dead fall ☐ dead stand-up

Symptoms scoring the palm:

Leaf symptoms		Healthy	Light	Medium	Important
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruiting bodies	Top	<input type="checkbox"/>			
	Bottom	<input type="checkbox"/>			
Crack (rot)	Top	<input type="checkbox"/>			
	Bottom	<input type="checkbox"/>			

Annexe 3 : Composition des milieux de culture utilisés

Water-Agar + Chloramphénicol + Streptomycine (WA-CS)

Le milieu water-agar est un milieu sélectif pauvre en nutriments, additionné de deux antibiotiques, le chloramphénicol et la streptomycine, afin de limiter la prolifération de contaminations fongiques ou bactériennes. Il est utilisé afin de purifier nos isolat dans le but d'obtenir une culture pure.

- **Agar**, (Sigma ref# A7002-250g), **15g.l⁻¹**
- **Chloramphénicol**, (Sigma ref# C0378-25g), **0,5g.l⁻¹**
- **Streptomycine** (Sigma ref# S9137-50g), **0,5g.l⁻¹**

PDA-Chloramphénicol (PDA-C)

Le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) est un milieu de culture fongique classique, auquel est ajouté du chloramphénicol afin de limiter les contaminations (PDA-C).

- **PDA**, (Sigma ref# 70139-500g), **39g.l⁻¹**
- **Chloramphénicol**, (Sigma ref# C0378-25g), **0,5g.l⁻¹**

Les milieux WA-CS et PDA-C sont autoclavés 20 minutes à 121°C puis refroidis à température ambiante jusqu'à 37°C environ. Les milieux sont ensuite distribués dans des boîtes de Pétri (20 ml par boîte) en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Après gélification du milieu à l'intérieur des boîtes, ces dernières sont ensuite ensachées en conditions stériles et conservées en chambre froide (4°C) jusqu'à leur utilisation.

Pour la préparation des milieux de culture avec film de nitrocellulose, ces derniers sont autoclavés 20 minutes à 121°C, puis déposés de façon stérile sur les boîtes de gélose sous une hotte à flux laminaire. Les milieux de cultures sont alors conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN par Doležel-MATAB avec broyage à l'azote liquide

- 1- Broyer le mycélium avec un mortier et de l'azote liquide
- 2- Transférer la poudre dans un tube eppendorf de 13ml
- 3- Ajouter 7,5ml de tampon Doležel (auquel on ajoute préalablement 0,2% de β -mercaptoethanol et 0,5% de Triton-X 100), incuber 2h à t° ambiante avec agitation à 140rpm sur un agitateur orbital.
- 4- Centrifuger 20 min à 4 000g et élimination du surnageant, on récupère alors les noyaux dans le culot.
- 5- Reprendre le culot dans 6ml de tampon de lyse (auquel on ajoute préalablement 0,2% de β -mercaptoethanol et 4% de MATAB (CTAB), frais : mélange du MATAB dans son tampon maximum deux jours avant).
- 6- A cette étape, on congèle les culots à -20°C (prochaines étapes longues donc difficile de tout faire en une journée).
- 7- Réaliser la lyse des noyaux au bain-marie 65°C , 4h avec agitation
- 8- Ajouter 6ml de chloroforme isoamylique (24/1 v/v) et agiter par retournement 5 min environ
- 9- Centrifuger 10 min à 3 000g et récupérer la phase aqueuse (étape à répéter une fois)
- 10- Ajouter 6 ml d'isopropanol à 4°C (V isopropanol 0,6 volume) pour précipiter l'ADN
- 11- Centrifuger à 3 000g, 5 min. Eliminer le surnageant avec précaution et laisser sécher le culot en retournant les tubes sur du papier absorbant pendant quelques minutes
- 12- Reprendre les culots dans 0,7ml de TE et transférer le tout dans un tube Eppendorf de 2ml
- 13- Purifier par précipitation avec 70 μl d'acétate de sodium et 0,6ml d'isopropanol
- 14- Centrifuger à 14 000g, 2min et éliminer le surnageant
- 15- Ajouter 1ml d'éthanol 70 %
- 16- Centrifuger à 14 000g, 2 min et éliminer le surnageant (attention au surnageant)
- 17- Sécher le culot au speed-vac quelques minutes puis reprendre le culot dans un volume d'eau à adapter en fonction de la taille du culot. A l'issu de cela, on conserve les ADN extraits à -20°C .

Annexe 5: (A) Programmes d'amplification par PCR des régions d'ADN spécifiques des marqueurs ITS, mt-SSU, nuc-SSU et nuc-LSU ; (B) Composition du mélange réactionnel pour l'amplification par PCR

30 cycles {	Programme d'amplification par PCR	Programme initial	Région ITS	nuc-LSU	nuc-SSU	mt-SSU
	Dénaturation initiale	96°C - 5 min	96°C - 5 min	96°C - 5 min	96°C - 5 min	96°C - 5 min
	Dénaturation	96°C - 30 sec	96°C - 30 sec	96°C - 30 sec	96°C - 30 sec	96°C - 30 sec
	Hybridation #1	55°C - 30 sec	65,8°C - 30 sec	52,8°C - 30 sec	65,5°C - 30 sec	58,1°C - 30 sec
	Hybridation #2	-	60,6°C - 30 sec	-	61,4°C - 30 sec	52,8°C - 30 sec
	Elongation	72°C - 1 min 30	72°C - 1 min 30	72°C - 1 min 30	72°C - 1 min 30	72°C - 1 min 30
	Elongation finale	72°C - 7 min	72°C - 7 min	72°C - 7 min	72°C - 7 min	72°C - 7 min
	Conservation	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞
	Primer forward	-	ITS1	LR0R	PNS1	MS1
	Primer reverse	-	ITS4	LR5	NS8	MS2
	Longueur Primer forward (pb)	-	22	17	31	25
	Longueur Primer reverse (pb)	-	23	17	20	22
	Tm [°C] Primer forward	-	65,8	52,8	65,5	58,1
	Tm [°C] Primer reverse	-	60,6	52,8	61,4	52,8
	% GC Primer forward	-	63,6	52,9	41,9	36
	% GC Primer reverse	-	47,8	52,9	60	31,8

Réactif	Matrice ADN (5ng.µL ⁻¹)	Tampon PCR 10X	dNTP (2mM)	MgCl ₂ (50mM)	Primer_forward (10 µM)	Primer_reverse (10 µM)	Taq (2U)	H ₂ O Milli-Q	Volume final (µL)
Volume (µL)	5	5	5	0,6	0,5	0,5	2,5	30,9	50

Annexe 6 - Echantillon DBGF10bis de *Ganoderma* spp. caractérisé par des méthodes morpho-anatomiques et en microscopie



Résumé

Le palmier à huile, *E. guineensis* Jacq., est la première plante oléagineuse cultivée dans le monde. *Ganoderma boninense* est un champignon basidiomycète tellurique identifié comme le principal phytopathogène fongique ravageur de ces cultures en Asie du Sud-Est. Il est responsable de pertes économiques importantes par affaiblissement, nécrose puis mort des arbres hôtes. Cette agro-industrie se retrouve désormais confrontée à l'émergence de champignons appartenant au genre *Ganoderma* au Cameroun. Toutefois, l'incidence, l'épidémiologie de la maladie ainsi les espèces de champignons impliquées diffèrent de ce qui a pu être observé en Asie. Ce projet de recherche a permis de réaliser une première caractérisation moléculaire de la diversité et la structuration génétique d'espèces du genre *Ganoderma* observées comme agressives en plantation au Cameroun, complétée par la caractérisation morpho-anatomique des échantillons indiquant des espèces morphologiquement différentes des *G. boninense* asiatiques. Ce travail a également permis la collecte de 43 échantillons de *Ganoderma spp.* sur des palmiers à huile au sein de 5 sites de plantations au Cameroun, l'obtention de 40 isolats en culture pure, la validation du protocole d'échantillonnage, ainsi que l'obtention de données génétiques pour une partie des isolats.

Mots clés: Ganoderma, palmier à huile, pourriture basale du stipe, Afrique, morphologie, phylogénie, nuc-SSU

Summary

The oil palm, *E. guineensis* Jacq., is the main oleaginous plant cultivated in the world. The fungi *Ganoderma boninense*, a telluric basidiomycota, has been identified as the main harmful phytopathogen of these cultures in South-East Asia. It is responsible of major economic losses due to weakening, necrosis and death of the host plant. This agro-industry is now confronted to the emergence of *Ganoderma* in Cameroon. However, the incidence and epidemiology of the disease, as well as the species involved, differ from what has been observed in Asia. During this research project, we realized a first molecular characterization of the diversity and genetic structuration of species of *Ganoderma* considered as aggressive in Cameroon's plantations, complemented by a morpho-anatomic description of the samples indicating morphologically distinct species compared to the asiatic *G. boninense*. During this project, the sampling protocol have been validated, 43 samples of *Ganoderma spp.* have been collected on oil palm trees in 5 plantation sites in Cameroon, from which 40 pure culture isolates have been produced, and partial genetic data have been obtained.

Keywords: Ganoderma, oil palm, basal stem rot, Africa, morphology, phylogeny, nuc-SSU